Développement d'un dispositif d'exposition contrôlé pour l'étude de l'impact neurotoxique de l'inhalation d'aérosols modèles de paraquat et de nano-objets de TiO2 : applications à des conditions neurodéveloppementales et neurodégénératives

Quentin Hamdaoui

▶ **To cite this version:**

Quentin Hamdaoui. Développement d'un dispositif d'exposition contrôlé pour l'étude de l'impact neurotoxique de l'inhalation d'aérosols modèles de paraquat et de nano-objets de TiO2 : applications à des conditions neurodéveloppementales et neurodégénératives. Toxicologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSEN019 . tel-03366332

HAL Id: tel-03366332
https://theses.hal.science/tel-03366332

Submitted on 5 Oct 2021

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.

Numéro National de Thèse : 2021LYSEN019

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée par

l'École Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale N°340

Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 28/06/2021 par :

Quentin HAMDAOUI

Développement d'un dispositif d'exposition contrôlé pour l'étude de l'impact neurotoxique de l'inhalation d'aérosols modèles de paraquat et de nano-objets de TiO_2 : Applications à des conditions neurodéveloppementales et neurodégénératives

---

Devant le jury composé de :

LANONE Sophie	Directrice de recherche INSERM (IMRB)	Rapporteure
LE BIHAN Olivier	Responsable Service Études (Air Breizh)	Rapporteur
BAEZA-SQUIBAN Armelle	Professeure (Université Paris Diderot)	Examinatrice
COSNIER Frédéric	Responsable de laboratoire (INRS France)	Examinateur
FLAMANT Frédéric	Directeur de recherche INRA (ENS de Lyon)	Directeur de thèse
BENCSIK Anna	Directeur de recherche ANSES (Lyon)	Co-encadrante
GAIE-LEVREL François	Ingénieur de recherche (LNE Paris)	Co-encadrant

Remerciements

Mon travail doctoral a été réalisé sous la direction du Dr Frédéric Flamant de l'École Normale Supérieure de Lyon (ENSL), co-encadré par le Dr Anna Bencsik de l'ANSES (site de Lyon) et le Dr François Gaie-Levrel du Laboratoire National de Métrologie et d'essais (LNE Paris). Ma thèse s'est déroulée en deux temps. J'ai effectué la première phase au sein du département « métrologie des gaz et des aérosols » au LNE Paris. J'ai ensuite réalisé la seconde phase à l'École Normale Supérieure de Lyon (ENSL), à l'institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), dans l'équipe « génomique fonctionnelle et signalisation thyroïdienne ». Ce projet a été financé par une bourse CIFRE accordée par l'Association nationale de la recherche et de la technologie (ANRT), issue de la collaboration entre le LNE Paris et l'ENSL, sous l'égide de l'école doctorale Biologie moléculaire intégrative et cellulaire (BMIC).

Cette thèse est le fruit d'un long travail et de beaucoup de rencontres, qui ont contribué à sa réalisation, tout en me soutenant moralement et scientifiquement au long de cette aventure.

En premier lieu, je tiens à adresser mes sincères remerciements au Dr Sophie Lanone et au Dr Olivier Le Bihan, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit, et au Pr Armelle Baeza-Squiban et au Dr Frédéric Cosnier pour leur participation comme jurys de cette thèse. Merci pour le temps accordé à la lecture et à l'appréciation de mon travail.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr Augustin Scalbert et le Pr Armelle Baeza-Squiban, d'avoir consacré du temps à l'avancement de ces travaux, afin que je puisse sereinement les mener à bien.

Je souhaite remercier Mmes Sophie Vaslin-Reimann et Tatiana Macé pour m'avoir permis d'intégrer le département « métrologie des gaz et des aérosols » au sein de la Direction de la Métrologie Scientifique et Industrielle où s'est déroulée la première partie de mon doctorat.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Frédéric Flamant, Anna Bencsik, et François Gaie-Levrel dont les travaux sont à l'origine de ce sujet de thèse, pour m'avoir épaulé scientifiquement tout au long de ce parcours de recherche. Merci d'avoir pris le temps de me guider tout au long de ce projet malgré vos emplois du temps très chargés.

Je tiens à remercier également le Dr Françoise Monéger, directrice de l'école doctorale BMIC, pour son soutien et ses conseils avisés.

Je suis également très reconnaissant des expériences soigneusement réalisées par Simon Delcour (LNE, département Comportement au feu et sécurité incendie), Paola Fisicaro et Caroline Oser (LNE,

département Biomédical et Chimie Inorganique), et Nicolas Gadot (CRCL, département de recherche translationnelle et d'innovation) dans le cadre de ce travail.

Je remercie Nicolas Feltin et son équipe de la plateforme CARMEN, ainsi que Sandrine Raveau pour leur aide et le soin apporté dans les réalisations menées ensemble.

Merci au Dr Charles Motzkus (CSTB) pour son soutien à l'occasion de ma première présentation orale à Aix-en-Provence, et d'avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions naïves de biologiste, concernant la mise au point d'un banc de génération d'aérosols.

Merci à l'équipe des gaz et des aérosols, pour m'avoir intégré chaleureusement à vos côtés. Merci à Christophe, Fabien, Fabrice, Laurent, Patrick et Thomas, votre bonne humeur et nos parties de cartes digestives m'ont beaucoup manqué à la suite de mon déménagement à Lyon.

Merci à l'équipe Flamant pour votre accueil à mon arrivée à l'IGFL. Merci à Denise, Karine, Romain, Sabine, Suzy, Sabine et Yanis, pour vos conseils, votre pédagogie, et votre aide inestimable lors des phases si chronophages dédiées aux dissections. Sans votre investissement, rien de tout cela n'aurait été possible.

Merci à toute l'équipe de l'animalerie du PBES pour votre bonne humeur au quotidien, pour avoir répondu à mes innombrables questions, et d'avoir hébergé mes petites protégées durant pratiquement deux ans. Un grand merci en particulier à : Agnès, Farida, Jean-François, Julie, Marie, Myriam, Nadine, Pierre et Tiphaine. Vous avez fait preuve d'une solidarité admirable pour tenir le navire à flot lors des périodes de confinement, qui ont porté un coup dur à l'expérimentation animale.

Un grand merci à Charlotte, pour ton aide et ta bienveillance, et de t'être occupée de mes impétueuses petites bestioles lors de mon déplacement à Paris.

Enfin, je tiens à témoigner ma reconnaissance à mon entourage qui m'a soutenu durant ces trois années. Merci à mes parents pour leur soutien indéfectible, leur sagesse et la relecture avisée de ce manuscrit. Enfin, merci à toi, Jeanne, pour avoir été à mes côtés, d'avoir vaillamment supporté stress, fatigue et distance, tout en étant un phare dans les moments de doutes et d'incertitudes.

Je remercie encore chaleureusement toutes les personnes impliquées directement ou indirectement dans ce travail de longue haleine, qui ensemble ont permis l'aboutissement de ce projet.

Résumé

L'émergence des nanopesticides, produits qui incorporent des nanomatériaux aux formulations des pesticides, soulève des questions quant aux effets sanitaires associés à leur pulvérisation. Aucune étude n'a encore exploré les effets de l'inhalation de substances mêlant pesticides et nanomatériaux, alors que certains de ces composés sont capables d'exercer des effets neurotoxiques, notamment en cas d'exposition au cours du neurodéveloppement. Il est ainsi nécessaire de proposer des modèles d'étude permettant l'évaluation du risque sanitaire associé à ces nouvelles technologies.

Ce travail doctoral interdisciplinaire a été réalisé conjointement au Laboratoire National de Métrologie et d'essais (LNE Paris) et à l'École National Supérieure de Lyon (ENSL), dans le cadre d'une convention CIFRE accordée par l'Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT). Ce projet a comporté deux parties. Il a premièrement consisté à mettre au point un dispositif d'exposition aux aérosols. S'inscrivant dans une démarche d'harmonisation des protocoles toxicologiques, cet outil répond aux exigences liées aux études des effets de l'inhalation, afin de permettre une procédure d'exposition fiable, reproductible et caractérisée métrologiquement. Dans une seconde partie, une étude chez le rongeur a été réalisée grâce au dispositif développé préalablement, mettant en jeu les aérosols de deux substances, un herbicide (le paraquat), un nanomatériau (le TiO_2), et leur mélange modélisant un nanopesticide. L'objectif de cette phase a été l'évaluation des effets neurotoxiques de l'exposition répétée aux aérosols d'intérêt, notamment afin d'étudier la survenue d'effets cocktails sur le cerveau.

Une chambre d'exposition a été mise en place et caractérisée métrologiquement, et son fonctionnement a été évalué sur le terrain, validant ainsi son usage comme outil approprié d'évaluation toxicologique. Malgré l'usage de concentrations d'exposition faibles et théoriquement sans effet toxique, l'analyse du transcriptome cérébral des animaux exposés *in utero* a permis d'identifier des modifications géniques pouvant refléter des altérations neurodéveloppementales, ce qui suggère que PQ et TiO_2 peuvent avoir des effets néfastes sur le cerveau en développement. Par ailleurs, nos résultats suggèrent des phénomènes d'interaction entre ces deux composés en mélange, qui modulent leurs effets toxicologiques. Nos résultats soulignent que la phase prénatale est primordiale dans l'évaluation du risque sanitaire associé à l'exposition aux polluants atmosphériques émergents comme les nanopesticides, ce qui confirme la nécessité d'avoir recours à des méthodes *in vivo* représentatives de scénarios d'exposition réalistes.

Abstract

The emergence of nanopesticides, novel agrochemicals including nanomaterials (NMs) in pesticide formulations, raises concerns regarding the health effects of these nano-enabled products that could be inhaled after being sprayed. No study has yet explored the inhalation effects of these new formulations which combine pesticides and NMs, although these compounds might be able to exert neurotoxic effects, especially when exposures occur during critical life stages. Therefore, as the chemicals used in the nanopesticide formulation could potentially cause cocktail effects which are currently not addressed, the development of new study models is essential to assess the health risk associated with these new technologies.

This interdisciplinary CIFRE thesis, granted by the ANRT, encompassed a metrological phase performed at the LNE Paris, to develop an aerosol exposure device dedicated to rodents. This device aims to fulfill the requirements of inhalation toxicology studies, to offer a reliable and reproducible exposure procedure. In a second part, this manuscript presents an *in vivo* study carried out at the ENSL thanks to the *ad hoc* device, which was used to generate three aerosols involving two substances, the paraquat herbicide (PQ), titanium dioxide nano-objects ($nTiO_2$), and their mixture modelling a nanopesticide. The objective was to evaluate the neurotoxic effects resulting from repeated exposures to our aerosols of interest to study the potential occurrence of cocktail effects on the brain.

A whole-body aerosol exposure chamber was set up and metrologically characterized. Its proper functioning was then evaluated in the field, thereby validating its use as an appropriate tool to explore aerosol inhalation effects in toxicology studies. Despite the use of low exposure concentrations considered theoretically safe, the transcriptome analysis of the animals exposed *in utero* has shown gene modifications that could highlight neurodevelopmental alterations, which suggested that PQ and $nTiO_2$ may have adverse effects on the developing brain. Furthermore, our results indicated that interactions between the PQ and $nTiO_2$ in mixture could occur, thus modulating their toxicological effects. Finally, our findings underpin that the prenatal phase is critical in the assessment of the health risk associated with the exposure to emerging atmospheric pollutants such as nanopesticides, which confirms the need to use *in vivo* methods depicting realistic exposure scenarios.

Table des matières

Remerciements ..... *iii*

Résumé ..... *v*

Table des matières ..... *vii*

Liste des figures et tableaux ..... *xiv*

Liste des abréviations ..... *xvii*

Chapitre 1. Introduction *1*

I. Les nanopesticides, une nouvelle application des nanotechnologies **2**

1. Définition 2

1.1. Les pesticides 3

1.1.1. Classification 3

1.1.2. Usages 5

1.1.3. Réglementation : une volonté de baisser les tonnages 5

1.2. Les nanomatériaux (NM) 6

1.2.1. Classification 7

1.2.2. Usages 9

2. Applications des nanopesticides 10

2.1. NPe organiques 13

2.1.1. Nanostructures 13

2.1.2. Emulsions 13

2.2. NPe inorganiques 14

2.3. Quels usages actuellement ? 14

2.4. Registre R-Nano 17

3. Un contexte réglementaire difficile et inadapté 19

4. Les nanoparticules de dioxyde de titane dans le paysage des nanopesticides 20

4.1. Présentation 20

4.2. Applications du $nTiO_2$ 21

4.2.1. Photoprotection 22

4.2.2. Photocatalyseur 23

4.2.2.1. Mécanisme 23

4.2.2.2. P25 $nTiO_2$ 24

4.2.2.3. Dégradation du Paraquat: un exemple de remédiation du $nTiO_2$ 25
4.3. Le $nTiO_2$ dans l'agriculture et les biocides 25
4.3.1. Nanofertilisant 25
4.3.2. Nanopesticide 26
II. Problèmes sanitaires soulevés par les nanopesticides 27
1. Impacts sanitaires des pesticides 28
1.1. Exposition 28
1.1.1. Voie cutanée 28
1.1.2. Voie orale 29
1.1.3. Voie respiratoire 29
1.1.3.1. Dispersion atmosphérique des pesticides 31
1.2. Les effets neurotoxiques des pesticides 34
2. Impacts sanitaires des NM 36
2.1. Dispersion environnementale 36
2.2. Effets écotoxicologiques 39
2.2.1. Spécificités des NM 39
2.2.2. Bioaccumulation et bioamplification 40
2.3. Paramètres toxicologiques 41
2.3.1. Absorption et distribution en réponse à l'inhalation de NM 41
2.3.2. Passage vers le système nerveux central 42
2.3.3. Clairance pulmonaire 44
2.3.4. Mécanismes de toxicité 45
2.3.4.1. Interactions avec la corona protéique 46
2.3.4.2. Stress oxydant et inflammation 46
2.3.4.3. Influences des caractéristiques physico-chimiques des NM 47
2.3.5. Les propriétés toxicologiques du $nTiO_2$ 48
2.3.5.1. Toxicocinétique 48
2.3.5.2. Toxicité expérimentale 50
2.3.5.3. Evaluation de la toxicité sur l'être humain 51
3. Le système nerveux, une cible potentielle des pesticides et des NM 52
3.1. Un domaine de recherche hérité de l'étude de la pollution particulaire de l'air 52
3.2. Le cerveau, un organe complexe à l'homéostasie fragile 53
3.3. Neurodéveloppement : une phase critique 55
3.4. Mécanismes d'action d'un NM neurotoxique 56
3.5. Le paraquat : un herbicide suspecté de provoquer la maladie de Parkinson 58
3.5.1. Présentation de la maladie de Parkinson 58
3.5.1.1. Pathogenèse 59
3.5.1.2. L' α-synucléine 60

3.5.2. Le Paraquat 61
3.5.2.1. Présentation 61
3.5.2.2. Effets toxicologiques 62
3.5.2.3. Mécanismes neurotoxiques 64
4. Notion de mélange et effets cocktails 67
4.1. Modulation des effets toxiques 67
4.2. Effets cocktails décrits entre NM et xénobiotiques 67
III. Les modèles d'étude toxicologique par inhalation 71
1. Les dispositifs d'exposition aux aérosols de NM 72
1.1. Méthodes d'exposition *in vivo* 72
1.1.1. Instillation/aspiration 73
1.1.2. Inhalation 74
1.1.2.1. Inhalation « nez seul » 74
1.1.2.2. Corps entier 75
1.2. La production d'aérosol 76
1.2.1. Les types de générateurs 76
1.2.2. Efficacité des générateurs 78
2. Développement d'une chambre d'exposition aux aérosols 79
2.1. Aspects éthiques et réglementaires 79
2.2. Caractérisation de l'exposition 80
2.2.1. Dose d'exposition 80
2.2.2. Modélisation de la dose déposée 81
2.2.2.1. Dépôt des particules dans les voies respiratoires 81
2.2.2.2. Le Modèle *Multiple-Path Particle Dosimetry Model* (MPPD) 83
2.2.2.3. Modélisation d'un dépôt de particules modèles 83
2.2.3. Dose retenue : mesures *in situ* des concentrations tissulaires 84
2.3. Caractérisation physico-chimique des aérosols 85
2.3.1. Distribution granulométrique des aérosols 85
2.3.1.1. Principe 85
2.3.1.2. Mesure 87
2.3.2. Morphologie et composition, état d'agglomération et d'agrégation 87
2.3.3. Concentration totale particulaire 88
2.3.3.1. Concentration massique 88
2.3.3.2. Concentration en nombre 89
2.3.4. Outils de caractérisation des aérosols 89
2.4. Choix et contrôle des conditions expérimentales 90
2.4.1. Environnement, caractéristiques de la chambre et modalités d'exposition 90
2.4.2. Difficultés expérimentales 91

2.4.2.1. Stabilité et homogénéité de l'atmosphère 92
2.4.2.2. Modélisation de l'homogénéité de l'atmosphère 93
2.5. Les dispositifs d'exposition corps entier dans le paysage scientifique actuel 93

IV. Conclusions de la partie 97

V. Objectifs de la thèse 99

1. Mise en place d'une chambre d'exposition aux aérosols 99
2. Étude de la neurotoxicité 100

Chapitre 2. Développement et caractérisation métrologique d'un dispositif d'inhalation 101

VI. Mise en place du dispositif : section méthodologique 102

1. Modèle de NPe 102
2. Prérequis 103
2.1. Exigences 103
2.2. Concentrations cibles 103
3. Chambre d'exposition 104
4. Dispositif de génération d'aérosols 106
4.1. Description 106
4.2. Paramètres environnementaux 107
4.3. Générateur – Principe de fonctionnement 109
4.4. Séchage de l'aérosol 110
5. Instruments de caractérisation des aérosols 111
5.1. Distribution granulométrique en nombre 111
5.1.1. SMPS 111
5.1.2. APS 112
5.2. Mesures gravimétriques 113
5.2.1. Mesures gravimétriques en temps réel : le TEOM 113
5.2.2. Mesure gravimétrique indirecte : le porte-filtre 114
5.3. Concentration en nombre 114
5.4. Analyse morphologique et composition chimique élémentaire 115
5.4.1. Prélèvement des aérosols : Mini Particle Sampler® (MPS) 115
5.4.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à l'EDX (Energie Dispersive de rayons X) 116
6. Analyse de la stabilité du PQ en solution avec le $nTiO_2$ 117
7. Simulation numérique des concentrations particulaires : CFD (*Computational Fluid Dynamics*). 118

VII. Caractérisation de la chambre d'exposition 119

1. Résumé de l'article 119

2. Caractérisation métrologique d'une chambre d'exposition aux aérosols pour explorer les effets de l'inhalation d'un mélange de paraquat et de nano-objets de TiO_2 121
INTRODUCTION 123
MATERIALS AND METHODS 125
RESULTS 129
DISCUSSION 132
CONCLUSIONS 136
FIGURES 137
SUPPLEMENTARY DATA 143
REFERENCES 145
3. Résultats complémentaires 149
3.1. Stabilité des distributions granulométriques 149
3.1.1. Stabilité spatiale 149
3.1.2. Stabilité temporelle 149
3.2. Analyse morphologique (MEB/EDX) 152
3.3. Suivi métrologique lors des expositions des animaux 155

Chapitre 3. Étude nanotoxicologique 158

VIII. Matériels et méthodes 159
1. Modèle animal 159
1.1. Étude sur le neurodéveloppement : NeuroDev (C57Bl6/j) 159
1.2. Étude subchronique sur la souris adulte : NeuroTox (TgM83) 160
2. Protocoles d'exposition 161
2.1. Étude du neurodéveloppement (NeuroDev) 161
2.2. Étude de la neurotoxicité chez l'adulte (NeuroTox) 163
3. Sacrifices et préparation des tissus 164
3.1. Protocole NeuroDev 164
3.2. Protocole NeuroTox 165
4. RNA-seq 165
5. Analyse Fonctionnelle GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 166
6. Rotarod 167
7. Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-MS) 168
8. Modélisation de la dose d'exposition via MPPD 169
9. Protocole d'analyses histologiques 170
9.1. Préparation des coupes cérébrales 170
9.2. Colorations immunohistochimiques 171
9.3. Analyse semi-quantificative du marquage immunohistochimique 172
10. Détection des marqueurs inflammatoires plasmatiques 173

IX. Effets neurodéveloppementaux associés à l'exposition *in utero* aux aérosols (NeuroDev)..... 175

1. Résumé de l'article..... 175
2. L'exposition prénatale aux aérosols de paraquat et de $nTiO_2$ altère l'expression génique du cerveau en développement..... 177

INTRODUCTION..... 179

MATERIAL AND METHODS..... 180

RESULTS..... 184

DISCUSSION..... 188

CONCLUSIONS..... 191

FIGURES..... 192

SUPPLEMENTARY DATA..... 199

REFERENCES..... 209

3. Résultats complémentaires..... 214
   3.1. Expression hépatique des enzymes de la défense antioxydante..... 214

X. Effets neurotoxiques associés à l'exposition des souris prédisposées aux maladies neurodégénératives (NeuroTox)..... 215

1. Évolution du poids corporel des animaux..... 215
2. Impact des traitements sur les performances locomotrices..... 216
3. Marqueurs plasmatiques de l'inflammation..... 217
4. Mesures histologiques au niveau cérébral..... 218
   4.1. Analyse du marquage immunohistochimique de la TH..... 218
   4.2. Analyse du marquage immunohistochimique de Iba-1..... 220
   4.3. Analyse du marquage immunohistochimique de la GFAP..... 223
5. Dose retenue de titane au niveau pulmonaire..... 225

Chapitre 4 : Discussion, perspectives et conclusion..... 228

XI. Discussion..... 229

1. Discussion méthodologique..... 229
   1.1. Aérosols générés..... 229
   1.2. Le modèle murin..... 231
   1.3. Outils analytiques du transcriptome..... 232
   1.4. Mesure du dépôt en titane et modélisation via MPPD..... 234
2. Quel bilan tirer de nos résultats ?..... 235
   2.1. Un dispositif d'exposition aux aérosols en accord avec nos objectifs..... 235
      2.1.1. Avantages du dispositif proposé..... 236
      2.1.2. Limites du dispositif..... 237

2.2. PQ et $nTiO_2$ ont un effet sur le cerveau fœtal, mais le mélange a un effet plus faible 238
2.2.1. Interprétation des résultats 238
2.2.2. Mécanismes potentiels des effets observés 241
2.2.3. Un effet diminué du mélange 243
2.3. Quels effets sur la souris adulte ? 244
2.3.1. Passage cérébral 245
2.3.2. Dépôt inférieur du mélange 246

XII. Perspectives 248

1. Quelles analyses ? 248
2. Quel avenir pour le dispositif ? 249

XIII. Conclusion 251

Annexes 252

Résultats complémentaires 252

Test de toxicité cellulaire des substances d'intérêt seules ou en mélange 253
Saisine du comité éthique 255

Valorisation de la thèse 256

Mes contributions en tant que doctorant 262

Bibliographie 263

Liste des figures et tableaux

Tableau 1. Exemples de familles chimiques de pesticides et leurs organismes cibles 4
Figure 1. Définitions et illustrations des NM manufacturés 8
Figure 2. Evolution de l'intérêt porté aux NM 10
Figure 3. Publications associées aux NPe 11
Figure 4. Classification des NPe 12
Tableau 2. Exemples rapportés dans la littérature de l'usage expérimental de NPe 15
Tableau 3. Recensement des NPe commercialisés 16
Figure 5. Conclusions du bilan R-Nano 2019 18
Figure 6. Recensement non-exhaustif des utilisations commerciales de $nTiO_2$ 22
Figure 7. Photocatalyse d'un polluant adsorbé à la surface du TiO_2 24
Tableau 4. Exemple des utilisations du $nTiO_2$ comme biocides 27
Figure 8. Dispersion aérienne des pesticides 32
Figure 9. Conclusions de l'expertise INSERM 2013 35
Tableau 5. Prédiction des concentrations environnementales en $nTiO_2$ 37
Figure 10. Les sources d'exposition aux NM manufacturés 39
Figure 11. Toxicocinétique des NM après leur inhalation 42
Figure 12. Translocation des NM vers le SNC 43
Figure 13. Mécanismes de clairance pulmonaire et de translocation des particules 45
Figure 14. Les espèces réactives de l'oxygène et la défense antioxydante 47
Tableau 6. Paramètres physico-chimiques des NM et effets biologiques 48
Figure 15. Caractéristiques du système nerveux 54
Figure 16. Évènements clés menant aux effets neurotoxiques des NM 57
Figure 17. Les voies dopaminergiques et leurs altérations 59
Tableau 7. Études réglementaires liées au PQ 63
Figure 18. Cycle catalytique du PQ 65
Figure 19. Mécanismes d'action du PQ sur le SNC 66
Figure 20. Illustration des effets cocktails possibles entre NM et xénobiotiques 69
Tableau 8. Articles écotoxicologiques mettant en lumière des effets cocktails. 70
Figure 21. Représentation des dispositifs d'exposition *in vivo* par voie pulmonaire 73
Tableau 9. L'exposition *in vivo* aux aérosols de NM, avantages et inconvénients 76
Figure 22. Méthodes principales de génération d'aérosol 78
Figure 23. Facteurs principaux impliqués dans la dosimétrie et le dépôt des particules 81

Figure 24. Illustration des mécanismes de dépôt particulaire dans les voies aériennes 82
Figure 25. Estimation de la fraction de dépôt particulaire via le modèle MPPD 84
Figure 26. Représentations de la distribution granulométrique des particules 86
Figure 27. Représentation des diamètres équivalents 87
Tableau 10. Exemple de méthodes de caractérisation physico-chimiques des aérosols 90
Tableau 11. Études nanotoxicologiques utilisant un dispositif exposition corps entier 95
Figure 28. Images de la cage utilisée comme enceinte d'exposition corps entier 106
Figure 29. Photographie et schéma du dispositif expérimental 108
Figure 30. Principe de fonctionnement du nébuliseur 110
Figure 31. Principe de fonctionnement d'un sécheur à diffusion 111
Figure 32. Principe de fonctionnement du SMPS 112
Figure 33. Principe de fonctionnement de l'APS. 113
Figure 34. Principe de fonctionnement du TEOM 114
Figure 35. Présentation du CPC 3007 115
Figure 36. Principe de fonctionnement du MPS 116
Figure 37. Présentation du MEB de la plateforme CARMEN 117
Figure 38. Cinétique de la dégradation du PQ par photocatalyse 118

Article N°1

Table 1. Mass and number concentrations 137
Figure 1. Experimental setup of the inhalation exposure chamber. 138
Figure 2. Average PNSD measured in the exposure chamber 139
Figure 3. Particle number concentrations 140
Figure 4. Average total mass concentration 141
Figure 5. Chamber pictures and their associated CAD model 142
Figure S1. Average temperature and relative humidity 143
Figure S2. Absorption spectrum of PQ 144

Figure 39. Homogénéité spatiale des aérosols 149
Figure 40. Mesures SMPS sous forme de matrices temporelles 151
Figure 41. Analyse du PQ sur grilles de ME 153
Figure 42. Analyse du nTiO_2 sur grilles de ME 154
Figure 43. Analyse du PQ + nTiO_2 sur grilles de ME 155
Tableau 12. Résultats des mesures métrologiques durant les deux campagnes d'exposition 156
Figure 44. Suivi en temps réel des concentrations en nombre moyennes 157
Figure 45. Photographie de la chambre d'exposition aux aérosols utilisée en animalerie 161
Figure 46. Protocole d'exposition des souris gestantes 162
Figure 47. Protocole d'exposition des souris de la lignée transgénique TgM83. 163
Figure 48. Illustration de la dissection du striatum 164

Figure 49. Photographie du Rotarod utilisé pour mesurer les capacités motrices des animaux 168
Figure 50. Illustrations des repères utilisés pour l'obtention des coupes frontales cérébrales 171
Figure 51. Exemple des coupes sériées du striatum de souris 172
Figure 52. Illustration de la quantification du marquage immunohistochimique 173
Figure 53. Principe de fonctionnement de la quantification enzymatique par Luminex®. 174

Article N°2

Table 1. Aerosol characteristics 192
Figure 1. Real time measurement of aerosol particle number concentrations 193
Figure 2. Plasmatic Markers of inflammation in pups exposed *in utero* 193
Figure 3. Transcriptome analysis of pups striatum 194
Figure 4. RT-qPCR relative gene expression 195
Figure 5. Gene Set Enrichment Analysis of striatum gene expression profiles 196
Figure 6. Gene Set Enrichment Analysis of striatum gene expression profiles 197
Table S1. Sequences of oligonucleotides for RT-qPCR 199
Table S2. Pulmonary exposure calculations 200
Figure S1. Follow-up of gestational parameters 201
Table S3. Characteristics of litters 203
Table S4. GSEA gene sets 204
Figure S2. Gene Set Enrichment Analysis of striatum gene expression profiles 208

Figure 54. Expression hépatique relative des enzymes de la défense antioxydante 214
Figure 55. Évolution poids corporel des animaux 215
Figure 56. Résultats aux tests du Rotarod 217
Figure 57. Quantification de deux marqueurs de l'inflammation plasmatique 218
Figure 58. Quantification de l'immunomarquage TH dans le striatum 219
Figure 59. Évolution temporelle de l'immunomarquage TH groupe PQ + nTiO_2 220
Figure 60. Quantification de l'immunomarquage Iba-1 222
Figure 61. Quantification de l'immunomarquage GFAP 224
Tableau 13. Résultats de la quantification du titane par ICP-MS 225
Figure 62. Résultats de la modélisation MPPD réalisée chez la souris 226
Tableau 14. Dose déposée des aérosols dans les voies aériennes des animaux 226
Figure 63. Résultats de la modélisation MPPD. 227
Tableau annexe S1. Échantillons histologiques disponibles 252
Tableau annexe S2. Poids des organes des animaux 253
Figure annexe 1. Test de viabilité cellulaire 254

Liste des abréviations

ADNc : ADN complémentaire

Adora2a : Adenosine Receptor A2a

ADP : Adénosine Triphosphate

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

APS : Aerodynamic Particle Sizer

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN Messager

Asyn : α-synucléine (gène *Snca*)

ATP : Adénosine Triphosphate

Bdnf : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BO : Bulbe Olfactif

CAD: Computer Aided Design

CARMEN : CARactérisation MÉtrologique des Nanomatériaux

CAT : Catalase

CECCAP : comité d'éthique en expérimentation animale de la Région Rhône-Alpes

CFD : Computational Fluid Dynamics

Chga : Chromogranin A

Chrna4 : Neuronal Acetylcholine Receptor Subunit Alpha-4

CIFRE : Convention Industrielle de Formation par la Recherche

CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer

CMMD : Count Median Mobility Diameters (Diamètre de mobilité électrique médian en nombre)

CNT : Carbon NanoTubes (Nanotubes de carbone)

CPC : Condensation Particle Counter (Compteurs de Noyaux de Condensation)

CRCL : Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Ct : Cervelet

Cx : Cortex

Cxcl11 : C-X-C motif chemokine 11

DEGs : Differentially Expressed Genes

DSE : Dose Sans Effet

DJA : Dose Journalière Admissible

DL : Dose léthale

DMA : Differential Mobility Analyzer

DMEM : Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium

DOPAC : 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid

Drd2 : D2 Dopamine Receptor

ECHA : European CHemical Agency

EDX : Energy-dispersive X-ray spectroscopy (Énergie Dispersive de rayons X)

EEC : Europeen Economic Community

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (European Food Safety Authority)

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ENM : Engineered Nanomaterials

ENSL : École Normale Supérieure de Lyon

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

Fa2h : Fatty Acid 2-Hydroxylase

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (Food and Agriculture Organization of United Nations)

FDR : False Discovery Rate

Fezf1 : Fez Family Zinc Finger 1

Gapdh : Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase

Gclc : Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit

GD : Gestating Day

GFAP : Protéine Acide Fibrillaire Gliale (Glial Fibrillary Acidic Protein)

GO : Gene Ontology

GPx : Glutathion Peroxydase

GR : Glutathion Réductase

Grina3 : Glutamate receptor

Grm4 : Metabotropic Glutamate receptor 4

GSD : Écart-type Géométrique (Geometric Standard Deviation)

GSEA : Gene Set Enrichment Analysis

HEPA : High-Efficiency Particulate Air

Hip : Hippocampe

IARC : International Agency for Research on Cancer (CIRC en Français)

Iba-1 : Ionized calcium-Binding Adaptator molecule 1

ICP-MS : Spectrométrie de Masse à Plasma à Couplage Inductif

IGFL : Institut Génomique Fonctionnel de Lyon

INERIS : Institut Nationale de l'Environnement Industriel et des Risques

INSERM : Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

KCl : Chlorure de potassium

Kcnc2 : Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily C Member 2

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LC : Concentration Léthale

LIBS : Laser Induced Breakdown Spectroscopy

LNE : Laboratoire National de Métrologie et d'Essai

LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level

MEB : Microscope Électronique à Balayage

Mes : Mésencéphale

MET : Microscope Électronique à Transmission

MFC : Mass flow controller (Régulateur de débit massique)

MMAD : Diamètre Aérodynamique Médian en Masse

MMP : Matrix metalloprotease

Mobp : Myelin-associated oligodendrocyte basic protein

MONA : Métrologie Online et offline des NanoAérosols

MP : Maladie de Parkinson

MPPD : Multiple-Path Particle Dosimetry Model

MPPS : Most Penetrating Particle Size

MPS : Mini Particle Sampler

MPTP : 1-methyl-4-phenylpyridinium

MSigDB : Molecular Signatures Database

NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)

Nefh : Neurofilament heavy polypeptide

Nefl : Neurofilament light polypeptide

NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health

NIST : National Institute of Standards and Technology

NM : Nanomatériaux

NOAA : Nano-objets manufacturés, leurs agrégats et agglomérats

NP : Nanoparticule

NPe : Nanopesticide

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OECD TG : Organisation for Economic Co-operation and Development Test Guidelines

OSHA : Occupational Safety and Health Administration

PBES : Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris

PCA : Principal Component Analysis/Analyse en composante principale

PD : Parkinson Disease

PND : Post Natal Day

PNSD : Particle Number Size Distribution (Distribution granulométrique des particules en nombre)

PQ : Paraquat

Prkn : Parkine

RDM : Régulateur de Débit Massique

REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals

RH: Relative Humidity

RNA-seq : RNA-sequencing

ROS : Reactive oxygen species

Rtn4r : Reticulon-4 receptor

RT-qPCR : reverse transcription - polymerase chain reaction

SA : Substances Actives

SD : Standard Deviation (écart-type)

Selenot : Selenoprotein

SEM : standard error from the mean (erreur type de la moyenne)

SFR : Structure Fédérative de Recherche

SMPS : Scanning mobility particle sizer

SN : Substantia Nigra (Substance noire)

SNC : Système Nerveux Central

Snca : gène de l'α-synucléine

SNpc : Substantia Nigra pars compacta

SOD : Superoxyde Dismutase

S_R : Standard Deviation of reproducibility

St : Striatum

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T°C : Temperature

Tc : Tronc Cérébral

TEOM : Tapered Element Oscillating Microbalance

Th : Thalamus

TH : Tyrosine Hydroxylase

TiO_2 : Dioxyde de titane

$nTiO_2$: TiO_2 ultrafin

UV : Ultraviolet

VLEP : Valeur limite d'exposition professionnelle

Chapitre 1. Introduction

I. Les nanopesticides, une nouvelle application des nanotechnologies

Au cours de la deuxième moitié du 20ème siècle, la population humaine a doublé pour atteindre 7,8 milliards en 2020, et elle devrait atteindre environ 9,8 milliard en 2050 d'après les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé. En raison de l'évolution démographique rapide et du changement du standard de vie des pays émergents, il est estimé que la production agricole mondiale devra augmenter d'au moins 50% par rapport à son niveau de 2012 (The State of Food and Agriculture FAO, 2017). L'agriculture doit faire face à des problèmes de taille, en premier lieu concernant la surface agricole disponible, qui ne pourra croître sans avoir à rogner sur des espaces naturels se raréfiant. Également, les effets du changement climatique mettent en danger la stabilité des écosystèmes nécessaires aux cultures, tout en diminuant l'accès à l'eau de certaines régions, et en favorisant par ailleurs l'apparition de nouvelles espèces invasives. En outre, l'augmentation des taux de rendement par hectare a décliné progressivement depuis les années 1960. La culture du blé représente à elle seule 37% des surfaces cultivées mondiales, dont dépend la sécurité alimentaire d'au moins 35% de la population globale. Si le taux de croissance annuel moyen des rendements en blé atteignait 3% dans les années 1980, il décline lentement et représente désormais seulement 1,5% (Kah et al., 2019). À cette nécessité de proposer de nouvelles alternatives pour remédier à l'essoufflement du modèle agricole actuel, s'ajoutent les soucis environnementaux et sanitaires soulevés par l'usage généralisé des pesticides, dont le nombre de substances actives (SA) autorisées est en diminution. C'est pourquoi il existe une volonté croissante de proposer de nouveaux outils répondant aux problèmes induits par le modèle agricole conventionnel, tout en assurant une sécurité alimentaire au niveau mondial.

1. Définition

Les nanopesticides (NPe), contraction du préfixe nano- (du grec « nain ») et du terme pesticide, correspondent à une nouvelle génération de pesticides optimisés par l'usage des nanotechnologies. Bien qu'ils représentent plusieurs catégories de substances très différentes, ils peuvent être définis comme étant des produits qui incorporent des nanomatériaux (NM) manufacturés, soit en tant que SA, soit comme adjuvants pour améliorer les propriétés des pesticides conventionnels. De la même façon, le terme nanofertilisant peut être utilisé, pour désigner les produits incorporant des NM et destinés à améliorer la pousse des végétaux et les propriétés des sols. Afin de cerner cet objet d'étude et son positionnement au regard de la réglementation actuelle, les pesticides et les NM sont en premier lieu définis au cours de ce premier chapitre.

1.1. Les pesticides

Le terme « pesticide » est un terme générique désignant l'ensemble des produits ayant pour but de lutter contre les organismes jugés nuisibles (animaux, végétaux, champignons, etc.). Ils peuvent également servir pour réguler la croissance des végétaux, avoir des propriétés défoliantes ou dessiccantes, ou encore améliorer le stockage et le transport des denrées agricoles (Costa et al., 2013). Ils forment une vaste famille qui rassemblent plus d'un millier de SA différentes, dont l'usage très majoritaire est agricole. De plus, les pesticides rassemblent les produits destinés au traitement des matériaux (conservation du bois, des textiles…) et des surfaces non-agricoles (espace verts, voies ferrées, aéroports…). Par ailleurs, certains produits sont destinés à des usages domestiques (insecticides, acaricides…), vétérinaires ou bien à la sécurité sanitaire (désinfection des objets et surfaces, prévention du développement des vecteurs de maladie…). Les pesticides sont vendus sous la forme de préparations commerciales composées du mélange d'une ou plusieurs SA avec des adjuvants. Une SA a pour but de conférer une activité biologique au pesticide, tandis que les adjuvants (solvants, tensioactifs, conservateurs…), sont théoriquement dépourvus d'activité biologique propre, ils sont inclus dans la préparation afin de lui conférer les propriétés nécessaires à son utilisation. Ils ont par exemple pour but l'amélioration des propriétés physico-chimiques du mélange, en termes d'efficacité de la SA (synergistes), de stabilité de la préparation, de sécurité à l'usage, ou bien en termes de facilité d'emploi (manutention, stockage, conservation, application…) (Tann, 1999). Ils peuvent également être trouvés sous le nom de formulants ou coformulants. En France, le portail E-Phy catalogue l'usages des produits autorisés en agriculture, il recense 80 adjuvants et 2784 pesticides disponibles en 2020.

1.1.1. Classification

D'un point de vue réglementaire, quatre réglementations européennes distinctes coexistent concernant les pesticides : les produits phytosanitaires (Règlement (CE) N° 1107/2009), les biocides (Règlement (UE) N° 528/2012), les médicaments et produits à usage humain (Directive 2004/27/CE), et ceux à usage vétérinaire (Directive 2004/28/CE). Ces définitions juridiques portent sur l'usage des pesticides, et non sur leur nature, et ne sont pas mutuellement exclusives. À ce titre, une même substance peut être soumise à plusieurs réglementations. En pratique, le terme biocide désigne l'usage des pesticides en dehors du cadre agricole, des médicaments et des cosmétiques. À l'inverse, le terme de produit phytosanitaire s'applique à l'usage agricole des pesticides. Les pesticides nécessitent une autorisation de mise sur le marché, dont les modalités sont définies par le règlement européen REACH, afin que les fabricants et les importateurs de substances puissent entreprendre l'évaluation de la sécurité chimique des substances en fournissant les informations nécessaires à l'ECHA (European CHemical Agency).

Les produits phytosanitaires rassemblent plusieurs grandes catégories, nommées selon la nature de leur organisme cible:

- Les herbicides contre la croissance des adventices (appelées « mauvaises herbes »)
- Les fongicides contre le développement des champignons
- Les insecticides contre les ravages des insectes
- Les rodenticides contre les rongeurs
- Les acaricides contre les acariens
- Les nématicides contre les nématodes
- Les molluscicides contre les mollusques

D'autre part, les SA peuvent également être classées par familles chimiques (Tableau 1). Ces familles peuvent regrouper des substances dont les cibles sont différentes, par exemple les carbamates peuvent être à la fois des insecticides, des herbicides, ou des fongicides. Afin de s'affranchir d'une définition réglementaire variable au cours du temps, dans ce manuscrit le terme de pesticide désigne tout produit pouvant être utilisé dans la lutte contre un organisme au sens large (biocides et produits phytosanitaires).

Tableau 1. Exemples de familles chimiques de pesticides et leurs organismes cibles.

Familles	Exemples de SA	Organismes cibles
Pyridines-bipyridiliums	Paraquat, Diquat	Herbicides
Aminophosphates glycine	Glyphosate	Herbicides
Organochlorés	DDT, Chlordane, Lindane, Dieldrine, Heptachlore	Insecticides
Organophosphorés	Malathion, Parathion, Chlorpyrifos, Diazinon	Insecticides
Pyréthrinoïdes	Perméthrine, Deltaméthrine	Insecticides
Carbamates	Carbaryl, Carbofuran Asulame, Diallate Benthiavalicarbe	Insecticides Herbicides Fongicides
Phtalimides	Folpel, Captane, Captafol	Fongicides
Triazines	Atrazine, Simazine	Herbicides
Chloroacétamides	Alachlore, Métolachlore	Herbicides

Adapté de (INSERM, 2013).

1.1.2. Usages

L'optimisation des techniques agricoles a permis le doublement de la production mondiale de nourriture au cours des 50 dernières années. Si l'utilisation des premiers pesticides remonte à l'antiquité, par exemple en utilisant le soufre sur les vignes dans la Grèce antique (Costa et al., 2013), l'usage de substances chimiques comme pesticides a véritablement pris son essor après la seconde guerre mondiale, grâce au développement de la chimie organique. Elle a permis la synthèse d'un grand nombre de substances destinées à soutenir un système productiviste fondé sur la mécanisation, la sélection de semences à haut rendement et la monoculture. Ce nouveau système de production intensif est devenu le modèle agricole dominant et il s'est avéré nécessaire au maintien de la sécurité alimentaire mondiale (Bonner and Alavanja, 2017). Cependant, l'industrie agricole est restée vulnérable à la pression parasitaire malgré l'usage généralisé des pesticides, et il y a en effet une perte significative dans la production agricole, qui est attribuable aux parasites et aux maladies touchant les cultures, avec en moyenne 35% de perte avant la récolte, et de 10 à 20% après la récolte (Mesterházy et al., 2020).

L'utilisation mondiale des pesticides atteint environ 2 millions de tonnes par an. Les herbicides représentant 44%, les insecticides 29% et les fongicides 26% des tonnages utilisés, pour un chiffre d'affaire total d'environ 56 milliards de $ (Kah et al., 2019). Près de 400 SA sont autorisées en France, représentant environ 3000 produits commerciaux homologués. Ils représentaient 104 641 tonnes de SA utilisées annuellement en 2000, dont 94 600 tonnes en agriculture, faisant de la France le troisième consommateur mondial de pesticides, après les Etats-Unis et le Japon (Rapport sénatorial annexe 45). Cependant, ces tonnages épandus ont eu tendance à diminuer depuis la fin des années 1980, au vu des efforts importants consentis par les agriculteurs et l'amélioration de l'efficacité des SA, dans le but d'éviter que l'usage généralisé des pesticides ne nuise à la biodiversité et à la qualité des sols.

1.1.3. Réglementation : une volonté de baisser les tonnages

La mise en œuvre du plan Ecophyto lancé au cours du Grenelle de l'environnement (2007), avait pour ambition de diminuer l'utilisation des pesticides en France, en baissant de 50% les tonnages utilisés à l'horizon 2018. Cet objectif a été néanmoins révisé en 2009, provoquant la mise en place du plan Ecophyto 2, revoyant à la baisse ses objectifs jugés trop ambitieux, avec une échéance repoussée à 2025 et une diminution des tonnages de seulement 25% en 2020. Les dernières données gouvernementales disponibles étaient de 85 876 tonnes de SA en 2018, soit une augmentation de 22% entre 2009 - 2011 et 2016 - 2018 (moyenne triennale) (Plan Ecophyto : Note de suivi 2018 - 2019). En cause, la progression de l'artificialisation du territoire, l'apparition du phénomène de résistance chez les espèces ciblées (600 espèces d'insectes et 60 de végétaux), et des fluctuations climatiques pouvant être localement importantes. Malgré le fait que ce plan n'ait pas tenu ses objectifs, il montre la volonté politique de

réduire le recours massif et systématique aux pesticides. Par ailleurs, la loi n° 2014-110, dite loi "Labbé", interdit depuis 2017 l'utilisation des produits phytosanitaires destinés à l'entretien des espaces verts, de promenade, de voirie, et des forêts accessibles au public. En revanche, certains espaces ne sont pas concernés par cette loi, notamment les infrastructures de transport, les terrains de sport et les espaces de production sylvicole. La loi Labbé a été renforcée en 2019, par l'interdiction de vente aux particuliers des pesticides, à l'exception de ceux autorisés en agriculture biologique.

Dans chaque pays membre de l'union européenne, la vente d'un pesticide est soumise à un agrément préalable de la part des pouvoirs publics (directive 91/414/EEC), conformément aux règles édictées par l'ECHA. Sa vente est subordonnée à une autorisation de mise sur le marché, délivrée après examen du dossier fourni pour le fabricant aux autorités administratives (l'ANSES en France). Pour obtenir une homologation, l'évaluation d'un produit se fait en deux étapes. La SA seule fait d'abord l'objet d'une évaluation du risque pour l'homme et l'environnement. Ensuite, la formulation commerciale est évaluée par les autorités compétentes. Le dossier d'homologation est alors composé d'un dossier biologique (sélectivité et efficacité du produit pour la culture), d'un dossier toxicologique sur la santé humaine, et d'un dossier écotoxicologique relatif aux impacts environnementaux. À la suite du réexamen par la Commission européenne des pesticides disponibles sur le marché avant le 15 juillet 1993, et au renforcement des exigences en matière d'innocuité pour l'homme et l'environnement, le nombre de SA a été considérablement réduit. Il est passé d'un millier de SA autorisées en Europe à la fin des années 1980, à 423 en 2013.

1.2. Les nanomatériaux (NM)

Il existe plusieurs définitions des NM, partiellement conflictuelles. C'est pourquoi un travail d'harmonisation et de normalisation au niveau international a été initié depuis plusieurs années, afin de prendre en compte les critères de faisabilité métrologique et de pertinence biologique associés aux propriétés physico-chimiques des NM (Recommandations de la Commission, Octobre 2011). Au sein de ce manuscrit, nous retiendrons donc la définition proposée par la Commission européenne, définissant le terme nanomatériau ainsi :

« *Un nanomatériau est un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm (…). Dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50% fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil compris entre 1% et 50% (…). Tout matériau est à considérer comme relevant de la définition établie dès lors qu'il présente une surface spécifique en volume supérieure à 60 m^2/cm^3. Cependant, tout matériau qui, sur la base de sa*

répartition numérique par taille, constitue un nanomatériau est à considérer comme correspondant à la définition établie même s'il présente une surface spécifique en volume inférieure à 60 m²/cm³».

- Une **particule** désigne un fragment de matière suffisamment petit pour être considéré comme ponctuel, et possédant des contours physiques définis.
- Un **agrégat** désigne un ensemble constitué de particules associées fortement entre elles.
- Un **agglomérat** désigne un ensemble de particules ou d'agrégats, faiblement liés par des forces de Van der Waals, des forces électrostatiques ou des forces développées par les tensions de surface (Friedlander et al., 2000). Il est facilement séparable et sa surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels.

La définition de la commission européenne s'appuie sur la base de la répartition numérique en taille et la surface spécifique. Cependant, elle reste équivoque au sujet des « cas spécifiques » qui justifient d'abaisser la répartition numérique en taille à une valeur entre 1 et 50%. Par dérogation, les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone à paroi simple (dont une dimension <1 nm) sont par exemple considérés comme des NM. La législation est donc en évolution, en fonction des substances jugées préoccupantes, au travers de l'évolution des connaissances et des décisions politiques. Par ailleurs, la limite de taille retenue est arbitraire. À ce titre, la définition proposée par le SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), juge qu'il n'est pas rigoureux de limiter la NM à la gamme de taille inférieure à 100 nm. Il propose de retenir une échelle à trois niveaux de classement allant de 1 à 999 nm. Également, il n'est pas toujours possible de disposer de la caractérisation complète des NM, pour des raisons métrologiques (disponibilité et limite des techniques de mesures), économiques (coûts associés, compétitivité…) ou réglementaires (secret des affaires, protection des brevets…). À ces problèmes de définition et de caractérisation des NM, s'ajoutent des questions quant à la toxicité et au cycle de vie des NM, qui constituent des sources d'incertitude associées à leurs effets sanitaires. Par conséquent, ces différents éléments mènent à une certaine confusion et à un dialogue complexe entre les communautés scientifiques, les industriels, les décisionnaires politiques et le grand public à propos de l'usage des nanotechnologies.

1.2.1. Classification

Il existe deux types de nanomatériaux, les **nano-objets** et les **matériaux nanostructurés** (ISO/TS 80004-1:2015), correspondant chacun à des catégories de composés variés (Figure 1).

	Type d'objets		Exemples
Nano-objets	Nanoparticules	3 dimensions externes <100 nm	Nano-TiO_2, nano-Ag, nano-SiO_2
	Nanotubes (ou nanofibres)	2 dimensions externes <100 nm	Nanotubes de carbone, amiante
	Nanoplaques (ou nanofeuillets)	1 dimension externe <100 nm	Nanofeuillets d'argile
Matériaux nanostructurés	Agrégats et agglomérats de nano-objets		Poudres, colloïdes, aérosols
	Nanocomposites : nano-objets dans une matrice/surface		Nano-revêtements, nanocomposites à matrice polymère, métallique
	Matériaux nanoporeux		Charbon actif, zéolithe

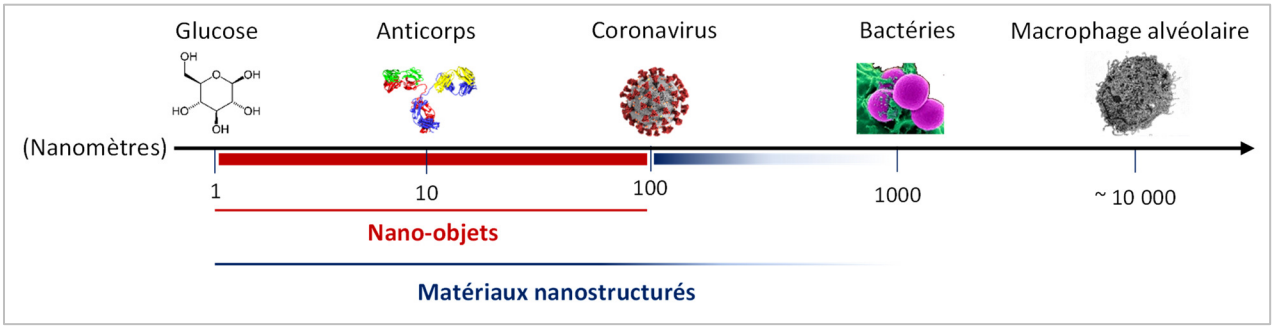


Figure 1. Définitions et illustrations des NM manufacturés. En tant qu'objets nanométriques singuliers, il existe une analogie entre l'échelle de ces réactions et celle à laquelle se produisent les processus biologiques, expliquant en partie leur réactivité avec le vivant.

La présence de NM est soumise à une obligation d'étiquetage pour les produits cosmétiques, les produits biocides et les denrées alimentaires, mais pas pour les produits phytosanitaires. Comme souligné dans la définition de la Commission européenne des NM, on distingue deux origines distinctes :

- Les NM d'origine naturelle, qui émanent notamment du volcanisme, des incendies, de l'érosion éolienne, d'origine biogénique…
- Les NM d'origine anthropique, émis non intentionnellement, générés par la combustion d'énergies fossiles, par le trafic routier, le secteur tertiaire ou agricole…
- Les NM manufacturés, produits à des fins technologiques.

Il existe également l'appellation « particules ultrafines », utilisée en référence aux polluants atmosphériques (NM d'origine naturelle ou émis de façon non-intentionnelle) plutôt qu'aux NM manufacturés. Bien que les NM d'origine naturelle aient toujours existé, il faut noter que ceux issus des

nanotechnologies possèdent des propriétés bien distinctes, en termes de nature et de caractéristiques physico-chimiques. Par soucis de concision, le terme NM utilisé dans ce manuscrit fait référence à ceux manufacturés.

La limite de 100 nm a été choisie pour les particules libres, car il s'agit de la taille sous laquelle les propriétés physico-chimiques singulières des NM sont observées (Borm et al., 2006). Cependant, ce choix est arbitraire, car cette transition des propriétés de la matière n'est pas brutale, et évolue de façon continue entre l'état brut et nanométrique des matériaux (Nanomaterials definition matters, 2019). Une taille nanométrique confère aux NM des propriétés uniques, en comparaison de leurs analogues de même composition, mais d'une taille supérieure, car les NM acquièrent des propriétés physico-chimiques différentes notamment grâce à l'apparition d'effets quantiques et de propriétés de surface. En effet, plus une particule est petite, plus elle possède un ratio surface/volume important, ce qui signifie une plus grande proportion d'atomes situés à sa surface. Conséquemment, à masse égale de matériau, un NM peut avoir une surface spécifique en volume plus élevée, et donc une réactivité plus importante (Roduner, 2006). Cette surface spécifique en volume est à considérer comme l'un des paramètres les plus pertinents pour décrire les conséquences toxiques des NM, elle correspond ainsi au produit de la surface externe du NM et de sa masse volumique. Les atomes en surface peuvent interagir avec leur environnement, ce qui induit des propriétés de surface et d'interface prédominantes par rapport aux propriétés de volume, provoquant ainsi des phénomènes accrus d'échange, d'adhérence et de réactivité chimique. Cependant la taille et la surface spécifique ne sont pas les seules propriétés à prendre en compte dans la réactivité des NM. La forme, la composition chimique, la solubilité, le potentiel zêta, la structure cristalline et les caractéristiques de surface sont autant de caractéristiques déterminantes. Outre leur taille, les NM ont donc des propriétés spécifiques qui complexifient l'évaluation de leur risque sanitaire en comparaison des substances chimiques conventionnelles.

1.2.2. Usages

Depuis le début du XXI^{ème} siècle, les nanotechnologies ont connu un essor considérable, comme en témoigne l'évolution récente du nombre d'articles traitant de cette thématique (Figure 2). Parallèlement, l'utilisation de NM dans des produits de consommation n'a cessé d'augmenter, de telle sorte qu'en 2013 le registre « The Project on Emerging Nanotechnologies » (inventaire 2013), avait déjà recensé 1600 produits contenant des NM. D'autre part, grâce au registre R-Nano et à l'obligation de déclarations des substances importées, fabriquées ou distribuées en France, le volume global de substances déclarées atteignait 399 717 tonnes, en 2019 (Rapport R-nano 2019). D'une manière générale, les NM inorganiques sont ceux les plus répandus dans les produits recensés (Vance et al., 2015).

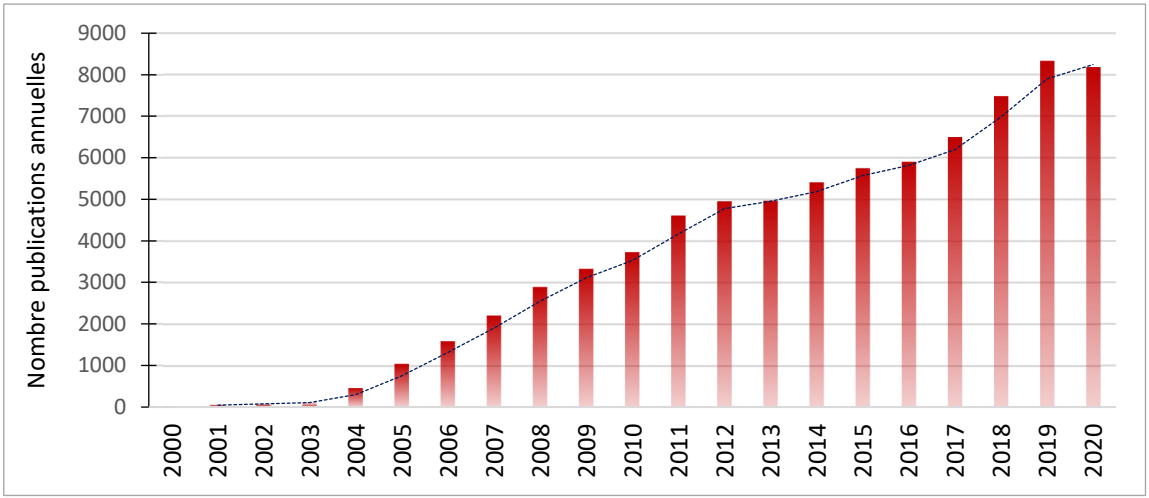


Figure 2. Évolution de l'intérêt porté aux NM dans la littérature scientifique, tous domaines confondus. Nombre de publications annuelles, terme recherché sur la banque de données Scopus (titre, mot-clé ou abstract) : « nanomaterial ».

2. Applications des nanopesticides

L'apparition de ce domaine d'étude est récente au sein de la recherche. L'analyse du nombre d'articles faisant référence aux NPe montre que le nombre de publications suit une augmentation annuelle significative et régulière, entre 2009 et 2020 (Figure 3). Il est important de noter qu'à l'instar des pesticides, l'usage de ces nouvelles substances ne se limite pas strictement au domaine agricole (produits utilisés aussi en sécurité sanitaire, biocides, produits vétérinaires, traitements des surfaces non-agricoles etc.). Les applications potentielles sont nombreuses et variées (Kah et al., 2013; Lowry et al., 2019; Pérez-de-Luque and Rubiales, 2009), mais elles ont globalement pour buts communs:

- L'augmentation de l'efficacité des SA ;
- L'optimisation de la stabilité et de la phytodisponibilité des SA ;
- La réduction des tonnages et des pertes environnementales de SA ;
- La baisse de l'empreinte carbone des techniques agricoles, en diminuant notamment la fréquence et la quantité des traitements.

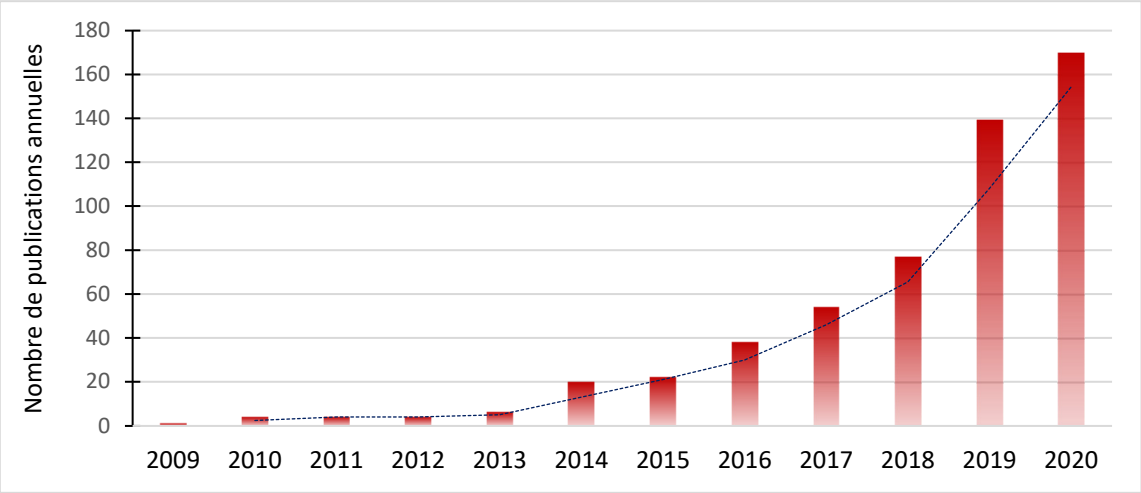


Figure 3. Publications associées aux NPe recensées dans la banque de données Scopus. Termes recherchés (titre, mot-clé ou abstract) : « nanopesticide » et « nanofertilisant ». Documents majoritaires : articles (68%), état de l'art (14%). Provenances principales des articles (entre 2009 – 2021) : Inde (16%), Chine (14%), Irak (14%) et Etats-Unis (14%).

Les NPe sont composés d'une grande variété de substances chimiques. Dans la littérature, on trouve des composés : carbonés (liposomes, polymères organiques…), issus de métaux ou d'oxydes de métaux (Ag, SiO_2, TiO_2, ZnO, CuO…), de métalloïdes (Si) ou autres. Ils peuvent être à la fois présents sous forme solide ou liquide. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) propose trois types de NM en usage dans le secteur agroalimentaire, sur la base de leur nature chimique : les composés organiques (formulés avec des lipides, des protéines ou des polymères), inorganiques (métaux, métalloïdes et argiles), et les composés mixtes (ou hybrides) combinant les deux précédentes familles (Peters et al., 2014). La plupart des NPe sont des nanostructures permettant l'encapsulation des SA. Le système de relargage de ces NPe repose sur le contrôle de leur diffusion, de leur dissolution et de leur dégradation. Beaucoup de SA sont faiblement hydrosolubles, ce qui rend nécessaire l'emploi de solvants organiques nécessaires à leur formulation au sein d'un pesticide. Mais ces solvants sont potentiellement plus toxiques que les SA en tant que telles. Pour éviter cela, l'usage d'émulsions huile/eau, permet d'augmenter la solubilité et donc la dose de SA délivrée. Ceci permet aussi les interactions avec les parties aériennes hydrophobes des plantes, en augmentant la pénétration au travers des cuticules. Ces formulations ont globalement pour but d'augmenter la phytodisponibilité et l'activité des SA, tout en diminuant leur risque de volatilisation et leur hydrolyse. Kah et al., (2018) ont analysé la littérature existante afin d'estimer le gain d'efficacité associé à l'usage des NPe. En fonction des produits, l'efficacité relative rapportée peut atteindre un facteur 10 par rapport aux produits conventionnels (sans NM), mais l'analyse montre que le gain d'efficacité médian est d'environ 20%. De la même façon, la productivité associée à l'usage de nanofertilisants pourrait permettre un gain de 20 à 30%. D'une façon générale, les auteurs soulignent la difficulté d'estimer avec précision, sur la base d'essais en laboratoire,

les rendements réels qui seraient obtenus à la suite du déploiement à grande échelle de ces nouvelles technologies. Des références aux NPe de plus en plus nombreuses peuvent être trouvées dans la littérature, et chaque produit présente des propriétés spécifiques induites par les technologies utilisées pour sa production et en fonction de son domaine d'utilisation. Les familles présentées dans cette partie rassemblent les grands archétypes qui se dégagent de la littérature (Figure 4).

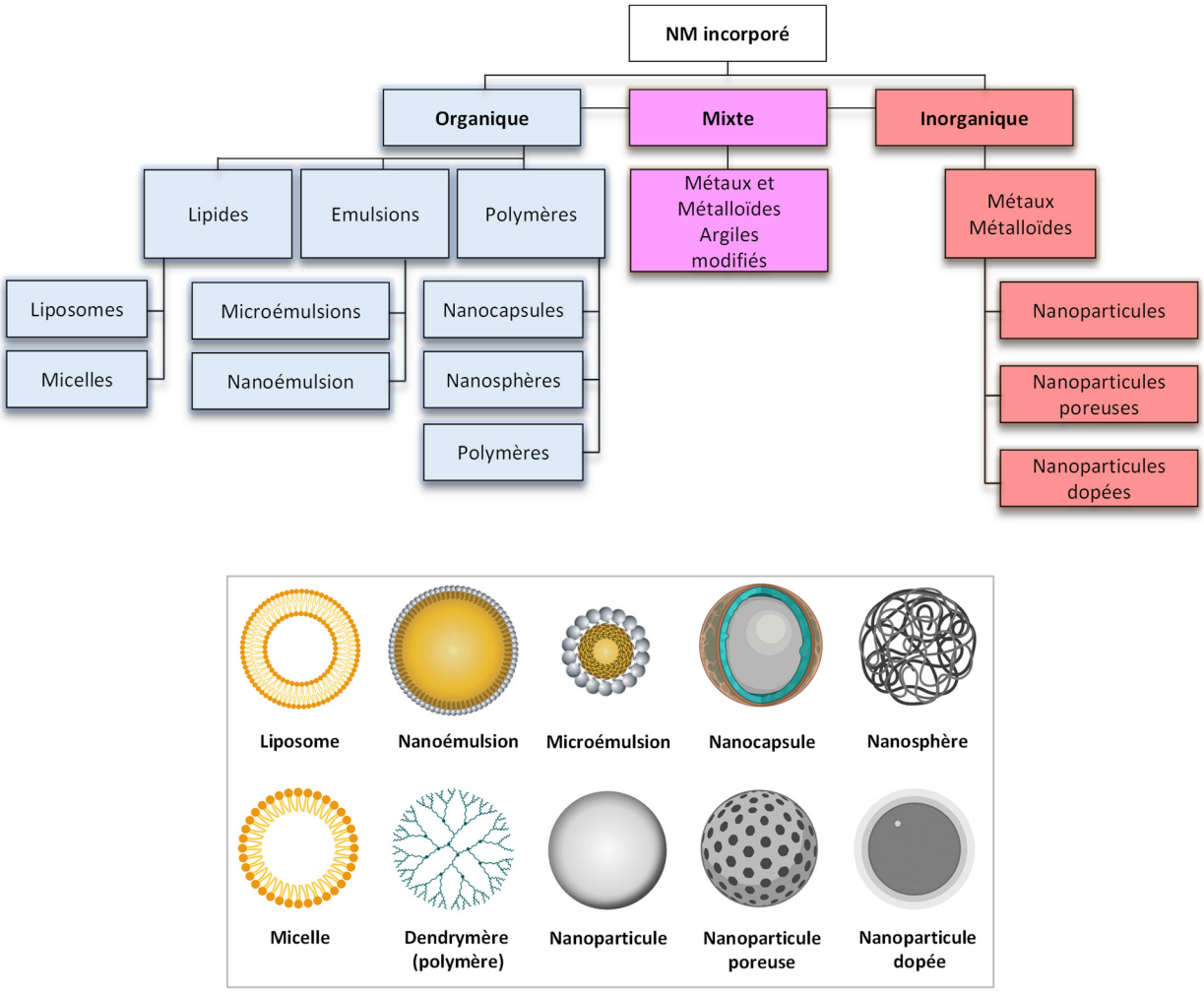


Figure 4. Illustration et classification des NPe réalisée sur la base des archétypes décrits dans la littérature ; cette classification peut varier en fonction des domaines d'étude, des innovations, des auteurs et des substances considérées. Les différentes familles proposées ne sont ni exhaustives ni mutuellement exclusives, car certaines substances recoupent les caractéristiques de plusieurs familles. Par exemple, les termes nanosphère/nanocapsules sont parfois rencontrés pour désigner tout NM utilisé comme vecteur d'une SA. Illustration créée avec BioRender.com

2.1. NPe organiques

2.1.1. Nanostructures

Les composés polymériques comprennent notamment les nanocapsules et les nanosphères, et sont utilisés comme transporteurs de la SA. Les nanosphères sont des structures permettant la dissolution ou la dispersion d'une SA dans une matrice. Certains auteurs font également référence aux nanosphères pour désigner une distribution non spécifique de la SA, liée à la surface de la nanosphère. À l'inverse, les nanocapsules présentent une structure noyau/enveloppe servant de réservoir pour les SA, dans laquelle elles sont piégées. D'autres structures polymériques peuvent être utilisées comme vecteur de transport des SA. À ce titre, les dendrimères sont des composés très utilisés. Ce sont des polymères hautement ramifiés, dont les caractéristiques peuvent être modulées afin d'augmenter leur affinité pour fixer les SA. Les dérivés de la chitine sont également très employés, notamment le chitosan. Ce polymère naturel très abondant et peu cher, permet de synthétiser des nanocapsules biocompatibles (Kumar, 2000). Par ailleurs, certains auteurs ont par exemple utilisé des nanocapsules de polyéthylène glycol comme vecteurs pour réduire la volatilisation et le taux d'application de l'huile essentielle d'ail pour lutter contre le ver de farine (Tribolium castaneum). L'efficacité rapportée atteindrait 80%, au lieu des 11% obtenus avec la SA seule (F.-L. Yang et al., 2009).

2.1.2. Emulsions

Les microémulsions (6 - 50 nm) sont des formulations aqueuses, thermodynamiquement stables, formant spontanément une émulsion de SA diluée dans une huile avec des surfactants (Kah et al., 2013). Les tailles particulaires impliquées, pourraient être environ 250 fois plus petites que celles des particules au sein des pesticides conventionnels. Il est intéressant de noter que certains produits sont arrivés sur le marché avant l'émergence des NPe comme nouvel outil technologique (Primo MAXX de Syngenta, vendue depuis 1993). Les nanoémulsions (50 - 200 nm) couvrent une gamme de taille similaire aux microémulsions, mais diffèrent par leur stabilité plus faible, car elles emploient des concentrations moindres de surfactants (5 - 10% contre 20% pour les microémulsions). Cependant, elles peuvent être privilégiées en cas de toxicité importante des surfactants utilisés.

Les micelles et les liposomes sont également des composés lipidiques couramment utilisés. Ces derniers sont formés de bicouches lipidiques sphériques, formées par la dispersion de lipides polaires dans un solvant aqueux. Ils possèdent par conséquent une similarité structurelle avec les bicouches phospholipidiques des organismes vivants, ce qui en fait des composés biocompatibles et biodégradables (Vasir and Labhasetwar, 2007). Ils sont également utilisés de façon routinière dans de nombreux autres domaines, notamment en galénique (formulation des médicaments) et en cosmétologie.

2.2. NPe inorganiques

Les composés métalliques (Ag, Au, Cu…), les oxydes de métaux (TiO_2, ZnO, Al_2O_3…) ou les métalloïdes (Silice) peuvent être utilisés pour formuler des NPe. Des composés hybrides existent également, notamment pour doper les propriétés de surfaces des nanoparticules. Les nanoparticules inorganiques peuvent être utilisées comme SA (action biocide) ou comme synergistes pour renforcer l'action cytotoxique d'un produit (nanoparticules de TiO_2, Ag, Si…). Elles peuvent être utilisées comme adjuvants pour protéger de la dégradation les SA photosensibles, ou à l'inverse provoquer la photodégradation (photocatalyse) de celles ayant une rémanence problématique dans les sols. Par ailleurs, elles peuvent servir de transporteurs dans le cas des particules poreuses. Les nanoparticules poreuses de silice peuvent être utilisées pour améliorer le relargage, la demi-vie, et la phytodisponibilité des SA. Li et al. (2007) ont proposé l'usage de Silice poreuse (cœur ~ 15 nm, pores de 4 - 5 nm) pour protéger une SA de la dégradation avec succès (l'Avermectine). Les nanocomposites proposent principalement des combinaisons dopant la réactivité des nanoparticules utilisées. Par exemple, la combinaison de nanoparticules Ag + TiO_2 (anatase poreuse), possède une activité insecticide en présence de lumière, qui est supérieure à celle des substances seules (Boxi et al., 2016).

2.3. Quels usages actuellement ?

En Europe, la base de données de l'ECHA des SA autorisées comme pesticides[1] n'a actuellement aucune entrée pour un pesticide associé à un NM. En s'appuyant sur la base de données Google Patents, Kah et al. (2019) ont dénombré entre 1990 et 2016, 3279 brevets déposés et 1254 ayant été accordés concernant les NPe. Cette banque de données ne prend cependant pas en compte les brevets brésiliens et indiens, qui sont des pourvoyeurs importants de l'industrie agrochimique. Les pays étant les contributeurs majoritaires ont également été rapportés, après examen des publications liées au NPe entre 2000 et 2013 (Kah et al., 2014). La plupart des articles provenaient de Chine (28%), d'Inde (20%) et des Etats-Unis (20%), avec 55% dédiés aux insecticides, 30% aux fongicides et 15% aux herbicides. Également, la majorité des articles étudiés reposait sur l'usage des polymères (environ un tiers), suivi de l'usage des nanoparticules inorganiques (TiO_2, Ag, Cu, Al). Une tendance à privilégier le développement de composés réputés biodégradables et biocompatibles est observable, avec l'usage des polymères tels que les polysaccharides (chitosan, alginate, amidon), l'usage de produits biologiques (la cire d'abeille, lécithines, l'huile de maïs, gommes diverses …) comme matrices souples, associées avec des SA d'origines naturelles (alcaloïdes, huiles essentielles…) qui sont généralement trop instables pour être utilisées seules (photosensibilité, oxydation rapide, dégradation microbiotique). Cette tendance peut également être visible, au vu des usages expérimentaux rencontrés dans la littérature. Des exemples

[1] http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN

représentatifs de ces applications sont rapportés dans le Tableau 2, montrant la diversité des usages et des approches utilisées par les différents auteurs.

Tableau 2. Exemples rapportés dans la littérature de l'usage expérimental de NPe, leur cible, et les propriétés conférées par les NM.

	SA	NM utilisés	Usage	Propriétés apportées	Référence
Insecticides	Chlorfenapyr	Nanoparticules de Silice	Synergiste + Nano-transport	↑ Efficacité	(Song et al., 2012)
	Thiaméthoxame	Dendrimères	Nano-transport	↑ Distribution et cytotoxicité	(Liu et al., 2014)
	Pyraclostrobine	Chitosan + Silice mésoporeuse	Nano-transport	↑ Distribution et cytotoxicité	(Cao et al., 2016)
	Triazophos	-	Nanoémulsion	Protection SA	(Song et al., 2009)
Herbicides	Paraquat	Matrice polymérique: PLGA[1]	Nanocapsule	↑ Distribution et stabilité ↓ pertes SA	(Grillo et al., 2014)
	2,4-D	Balle de riz nanométrique	Nano-transport	Valorisation déchet - Amendement (amélioration sol) ↓ pertes SA	(M. and Chidambaram, 2016)
	Métolachlore	PEG[2]–PLGA[1]	Nano-transport	↑ Efficacité et solubilité SA – ↓ solvants toxiques	(Tong et al., 2017)

«-» données manquante ; [1] PLGA : poly(acide lactique-co-glycolique) ; [2] polyéthylène glycol

Par ailleurs, le site StatNano[2] est une banque de données compilant les statistiques de publications indexées par l'Institute for Scientific Information (ISI) sur Web of Science (WoS) et les utilisations commerciales des nanotechnologies. Concernant le milieu agricole, on peut y trouver 36 produits déclarés par leurs fabricants comme étant des NPe (herbicides, insecticides, algicides, fongicides, biocides). Les produits présentant au minimum une référence aux NM dans la description fournie par le fabricant ont été résumés dans le Tableau 3.

[2] https://product.statnano.com

Tableau 3. Recensement des NPe commercialisés réalisé sur la banque de données de StatNano.

NOM COMMERCIAL	USAGES	SA	NM	PAYS	ENTREPRISE
BANNER MAXX FUNGICIDE	Fongicide	Propiconazole	Microémulsion	Suisse	SYNGENTA
NANOCU	Fongicide Bactéricide	Cuivre	NP de Cuivre	Egypte	Bio Nano Technology
APA PERIN	Insecticide vétérinaire	Perméthrine	-	Vietnam	APA United Nano Technology Co., LTD
NANOSULF	Fongicide Insecticide Fertilisant	Soufre	-	Inde	Alert Biotech
PESTICIDE ANTIBACTERIAL AGENT	Bactéricide	-	Nano-objets inorganiques chargés d'ions métalliques	Chine	Nanjing High Technology Nano Material
PESTICIDE SYNERGIST	Adjuvant Synergiste	-	Agents catalytiques	Chine	Nanjing High Technology Nano Material
PESTICIDE DEFLOCCULANT	Bactéricide Adjuvant	-	NM inorganiques	Chine	Nanjing High Technology Nano Material
BLUE LAGOON UV-BLOCK	Algicide	-	-	Allemagne	DENNERLE
ANTIALGAE DIRECT	Algicide	-	-	Allemagne	DENNERLE
NANOSEPT®AQUA SUPER	Biocide	Peroxyde d'hydrogène	NP d'Argent	Hongrie	Nanosept
FERTIMATE NATURAL PESTICIDE	Pesticide Fertilisant	Léonardite	-	Taiwan	Organic Fertilizing
NEUDELTA-2.5EC	Insecticide	-	-	Allemagne	Neufarm GmbH
NEUTREFLEN-48EC	Herbicide	-	-	Allemagne	Neufarm GmbH
NANO BROWN SUGAR	Herbicide	-	-	USA	MAX Systems LLC
NANOREVOLUTION ™ 3.0	Herbicide Adjuvant	-	-	USA	MAX Systems LLC

«-» Données absentes

Produits déclarés par les fabricants comme incorporant des NM (mise à jour en Janvier 2021).

Les NPe développés actuellement consisteraient majoritairement en la reformulation de SA déjà utilisées en agriculture conventionnelle, ayant des propriétés herbicides, insecticides, fongicides et

biocides. Les nouvelles formulations des SA impliquent des matrices organiques et des composés inorganiques (nanoparticules de silice, cuivre, Ag, TiO_2…) ou hybrides (polymères + silice, argiles modifiés…). Les NM ont fait l'objet d'un intérêt croissant de la part du secteur agrochimique, qui développe actuellement un nombre important de brevets associés à ces nouvelles technologies (Kah et al., 2013; Pérez-de-Luque and Rubiales, 2009). Les entreprises leaders de l'industrie agrochimique (Syngenta, Bayer, Monsanto, Sumitomo, BASF, and Dow Agrosciences…) ont d'ailleurs déposé des brevets comprenant une vaste gamme de protocoles de productions et d'applications de formulations encapsulées, utilisables notamment comme NPe (Perlatti et al., 2013). Cependant, une identification précise et exhaustive de ces usages est impossible à l'heure actuelle, car l'industrie agrochimique ne communique que rarement des informations sur les produits incorporant des NM. Les pesticides et l'usage des « nano » sont en effet deux sujets sociétaux sensibles, qui ne poussent pas à la transparence les différents acteurs de l'industrie des pesticides, notamment par peur d'un phénomène de rejet social (Kah, 2015).

2.4. Registre R-Nano

La réglementation relative à la mise sur le marché des produits phytosanitaires ne prévoit pas explicitement d'exigences spécifiques pour les NM présents dans un produit. Comme la formulation des pesticides dédiés à l'agriculture est protégée par le secret industriel, et que ces produits ne sont soumis à aucune obligation légale d'étiquetage « nano », il est très difficile d'identifier précisément quels sont les NPe déjà commercialisés. En France, il existe cependant le portail R-Nano, un registre mis en place depuis 2013, qui recense les déclarations obligatoires de l'usage des NM pour les professionnels (entreprises et laboratoires publics et privés, produisant, important, ou distribuant plus de 100 grammes d'une substance) sous couvert de confidentialité. C'est la première plateforme de ce type mise en place au monde, elle fait suite aux engagements pris lors du Grenelle de l'environnement pour mieux évaluer la balance bénéfice/risque liée à l'émergence des nanotechnologies. Cette plateforme gérée par l'ANSES recense annuellement l'usage de plus de 500 000 tonnes de NM, communiqué par 3036 déclarants (R-Nano, 2019). Ainsi, un secteur d'utilisation arrive en tête tous les ans depuis 2014: l'agriculture. Sur les 9 595 déclarations obtenues en 2019, 60% étaient dédiés au secteur d'utilisation « Agriculture, sylviculture, pêche » (Figure 5). Une quarantaine de substances différentes ont pu être recensées (Alumine, argiles diverses, calcium, cuivre, dioxyde de titane, silice, pigments...). Néanmoins, la réglementation n'impose aucune déclaration obligatoire sur le tonnage précis, ainsi que sur la nature, les propriétés et les usages des NM incorporés. Ces résultats ne reflètent pas nécessairement l'utilisation d'un fort tonnage de NPe au sein du système agricole. En effet, il existe un nombre élevé d'intermédiaires dans cette filière, entre les fabricants, les distributeurs et les utilisateurs professionnels. Ceci ne permet pas de comparer directement les différents secteurs d'utilisation, possédant chacun des

réseaux de distribution différents. Ce nombre de déclarations permet donc de mettre en lumière un usage généralisé des NM en agriculture, qui tend à augmenter avec le temps, mais ce seul paramètre ne permet pas d'inférer que le secteur agricole est le plus gros consommateur de NM en France actuellement.

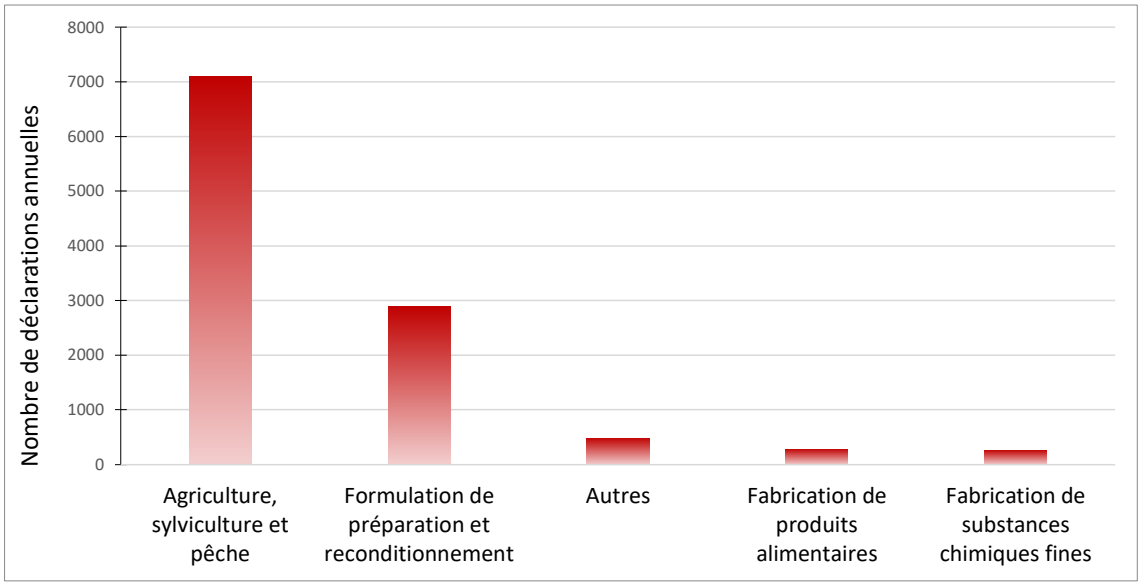


Figure 5. Conclusions du bilan R-Nano 2019, registre du nombre des déclarations de l'utilisation, la distribution, et la fabrication des substances « nano ».

L'ANSES, dans son dernier rapport sur les déclarations R-Nano (Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective, Novembre 2020), a insisté sur le fait qu'un nombre important de paramètres nécessaires à l'évaluation du risque ne sont pas renseignés (quantité, taille, surface spécifique, la nature des enrobage, potentiel zêta…). Pour pallier ce déficit d'informations, l'ANSES a procédé spécifiquement à une étude de la filière d'approvisionnement en produits phytosanitaires auprès de 1000 destinataires détenteurs d'une autorisation de mise sur le marché (produits phytosanitaires, biocides ou fertilisants). Il leur a été demandé des précisions portant sur les déclarations de produits contenant des NM, pour savoir s'il s'agissait de SA ou d'adjuvants, et pour fournir des éléments complémentaires sur leur caractérisation. Le taux de réponse a été de 25% seulement. Par ailleurs, aucune SA à l'état « nano » n'a été déclarée, ce qui confirme l'utilisation majoritaire des NM sous forme d'adjuvants. Les adjuvants suivants ont ainsi été répertoriés, malgré l'absence d'informations précises à leur sujet : silice, terre de Fuller, attapulgite, pigments, argiles modifiées.

3. Un contexte réglementaire difficile et inadapté

Bien que de nombreux exemples de NPe aient été rapportés, il est difficile d'établir clairement si un NPe signalé dans la littérature scientifique est actuellement à un stade conceptuel, au stade de recherche et développement, ou bien s'il est déjà sur le marché. De plus, il n'existe actuellement pas de définition univoque et harmonisée des NPe, ni de recensement officiel de leur utilisation (Grillo et al., 2021). Dans le contexte actuel, les NPe peuvent correspondre ou non, à la définition d'un NM, en fonction des produits et des réglementations considérées. La gamme de taille des NM utilisés dans les NPe et rapportée dans les dépôts de brevets ou dans la littérature varie très largement, et peut aller jusqu'à plus de 2 µm (Gogos et al., 2012), ce qui ne correspond donc pas strictement à la définition d'un NM retenue par la Commission Européenne. Cependant, ils sont présentés comme NPe par leurs auteurs, et ils incorporent le plus souvent une fraction de leurs composants dans une gamme de taille nanométrique. Par exemple, il est reconnu que les microémulsions, malgré leur appellation trompeuse, ont une taille inférieure à 100 nm (De et al., 2014; Kah et al., 2013), et donc peuvent correspondre à la définition d'un NM. À l'inverse, les nanoémulsions pourraient ne pas être considérées comme « nano » au vu de leur gamme de taille (50 – 200 nm), en dépit du fait qu'elles possèdent des qualités propres aux NM (similaires aux microémulsions) en comparaison des composés de même nature mais de taille supérieure. Par ailleurs, certains articles ont utilisé indifféremment des nano-formes de pesticides et de biocides comme modèles de NPe, même si elles diffèrent en termes de modes d'action et d'espèces cibles, et sont couvertes par des cadres réglementaires différents. Cette situation confuse favorise un emploi incorrect du préfixe « nano » (Villaverde et al., 2017). D'une part, certains utilisent le terme de NPe pour la connotation novatrice du terme « nano » à des fins marketing. D'autre part, il a été remarqué que le terme « nano » peut être omis des produits commercialisés pour éviter qu'ils soient stigmatisés et perçus comme des composés dangereux par les utilisateurs.

En Asie, en Afrique et en Océanie, la réglementation des NM pour l'agriculture est traitée de manière hétérogène (Subramanian et Rajkishore, 2019). En Inde par exemple, des lignes directrices ont été publiées pour définir et évaluer les NPe (Guidelines for evaluation of nano-agri input products and nano-agriproducts[3]), bien qu'il n'y ait pas encore de cadre politique et réglementaire mis en place, notamment pour définir clairement les NPe. Malgré l'absence d'une définition harmonisée, l'évaluation des risques environnementaux des pesticides est requise avant que le produit dispose d'une autorisation de mise sur le marché. En tant que tels, les NPe sont donc soumis au même processus de surveillance sanitaire que les pesticides conventionnels, tout en abordant spécifiquement les propriétés caractéristiques de l'échelle nanométrique. En Europe, tout pesticide doit passer par un processus rigoureux d'évaluation des risques avant d'arriver sur le marché. Dans le cas d'une forme nano d'une SA déjà existante (par exemple, le

[3] http://www.dbtindia.gov.in/regulations-guidelines/guidelines-evaluation-nano-agri-input-and-nano-agri-products

cuivre), l'approbation de la commercialisation d'une nouvelle forme NPe est nécessaire. Cela signifie qu'un pesticide déjà approuvé et produit sous forme nanométrique, devra être traité comme une nouvelle entité nécessitant une évaluation de ses risques sanitaires.

Néanmoins, comme il existe des incertitudes importantes concernant les mécanismes d'action des NPe, leurs effets sur l'environnement et leurs effets sanitaires (White and Gardea-Torresdey, 2018), certains auteurs ont déjà mis en lumière que le cadre réglementaire mis en place pour les pesticides, ne répond pas aux spécificités des NPe induites par la présence des NM dans leur formulation (Kookana et al., 2014). Les changements des caractéristiques physico-chimiques des produits, et leurs conséquences toxicologiques pourraient ne pas être correctement évalués par les tests actuels. En effet, à l'instar des pesticides conventionnels, les NPe peuvent être disséminés involontairement dans l'environnement lors de leur utilisation. Chacun des compartiments environnementaux (air, eau et sol) possède ses propres particularités, ce qui nécessite une évaluation du risque spécifique, en particulier lorsque les contaminants sont présents sous des formes dispersées à de faibles concentrations (Agathokleous et al., 2020). Ces nombreuses sources d'interrogations représentent donc un défi majeur pour permettre une adéquation entre les tests de toxicité réglementaires actuels et l'émergence de ces nouveaux produits aux propriétés complexes et singulières (Grillo et al., 2021; Kookana et al., 2014, 2014; Villaverde et al., 2017). À cet égard, le groupe consultatif scientifique de la loi fédérale américaine sur les insecticides, les fongicides et les rodenticides (FIFRA) a examiné les pesticides contenant des oxydes métalliques à l'état nanoparticulaire[4]. Il a estimé que les risques pour la santé et l'environnement de ces NM peuvent être différents de ceux des pesticides conventionnels et que les méthodes actuelles ne seraient pas adéquates pour évaluer leur devenir et leurs conséquences environnementales. Par conséquent, l'évaluation sanitaire des NPe devra nécessairement prendre en compte la toxicité environnementale et humaine associée aux composants individuels présents dans la formulation, mais aussi les différents composés en mélange, afin d'analyser les altérations des propriétés du produit final induites par de potentiels effets cocktails.

4. Les nanoparticules de dioxyde de titane dans le paysage des nanopesticides

4.1. Présentation

Le titane est le 9ème élément le plus abondant de la croûte terrestre, il peut être utilisé par l'industrie sous sa forme pure métallique (non naturelle) dans les alliages, pour sa légèreté et sa résistance, ou bien sous sa forme naturelle minérale, le dioxyde de titane (TiO_2) (Shi et al., 2013). Il n'y a pas de rôle biologique du TiO_2 décrit chez les mammifères. L'apport journalier est estimé à 0,8 mg par l'alimentation, bien qu'il ne soit pas ou très faiblement absorbé. Il est considéré comme un élément

[4] https://archive.epa.gov/scipoly/sap/meetings/web/html/110309ameeting.html

inerte (non toxique), c'est pourquoi il a été choisi en premier lieu pour remplacer les pigments à base de plomb dont la toxicité est désormais avérée. À l'inverse, c'est un oligo-élément pour les plantes. Elles en contiennent généralement 1 à 2 p.p.m (poids sec), et certaines peuvent en contenir jusqu'à 80 p.p.m (ortie, prêle). Le TiO_2 peut avoir un effet bénéfique sur les végétaux, stimulant la production de glucides, la croissance et la germination, bien que les mécanismes précis ne soient pas encore élucidés (Emsley, 2011).

Le TiO_2 est utilisé tout d'abord sous sa forme dispersée micrométrique comme pigment blanc (papier, peintures, plastiques, encres…), depuis l'interdiction en Europe du blanc de saturne (1993), pigment à base de plomb. Avec les oxydes de fer et le noir de carbone, le TiO_2 fait partie des pigments les plus utilisés à travers le monde. Il possède des qualités spécifiques (semi-conducteur, stabilité, pouvoir couvrant, éclat…) et un coût de revient qui le rendent très attractif pour un grand nombre d'industries (Piccinno et al., 2012). Il existe plusieurs formes du TiO_2 différant par leurs formes cristallines et leurs granulométries, dont trois sont majoritairement utilisées: la rutile, l'anatase et la brookite. Elles se présentent comme des poudres blanches, commercialisées sous deux formes à la distribution granulométrique distincte :

- Le TiO_2 fin, formé de particules primaires d'un diamètre compris approximativement entre 200 et 400 nm, ayant une surface spécifique de 5 à 15 m^2/g (20 - 60 m^2/cm^3).
- Le TiO_2 ultrafin ($nTiO_2$), dont au moins 50% des particules primaires, dans leur répartition numérique par taille, présentent un diamètre inférieur à 100 nm. Il possède une surface spécifique bien supérieure au TiO_2 fin, de 10 à 300 m^2/g (40 - 1200 m^2/cm^3).

4.2. Applications du $nTiO_2$

Le TiO_2 constitue la base de la plupart des colorants de peinture, des revêtements et des plastiques. Cette utilisation représente plus de 50% des tonnages mondiaux utilisés. Par ailleurs, un grand nombre de secteurs industriels l'utilisent pour ses différentes propriétés (Figure 6). La forme pigmentaire représente 98% de la production européenne (Gaffet et al., 2018) de TiO_2. Elle est utilisée pour son indice élevé de réfraction de la lumière et son pouvoir couvrant. Le TiO_2 étant capable d'absorber les rayons ultraviolets (UV), il confère donc aux produits qui en incorporent une photoprotection ou un pouvoir photocatalytique, qui est d'autant plus important lorsque les particules sont nanométriques. D'après les données du registre R-Nano, les nanoparticules de TiO_2 font partie des 4 types de NM les plus produits ou importés en France (Rapport 2019). Sur la base des tonnages de production mondiale, les nanoparticules de TiO_2, de SiO_2 et d'oxyde de zinc sont les NM les plus fabriqués, avec plus de 200 000 tonnes produites chaque année concernant le $nTiO_2$.

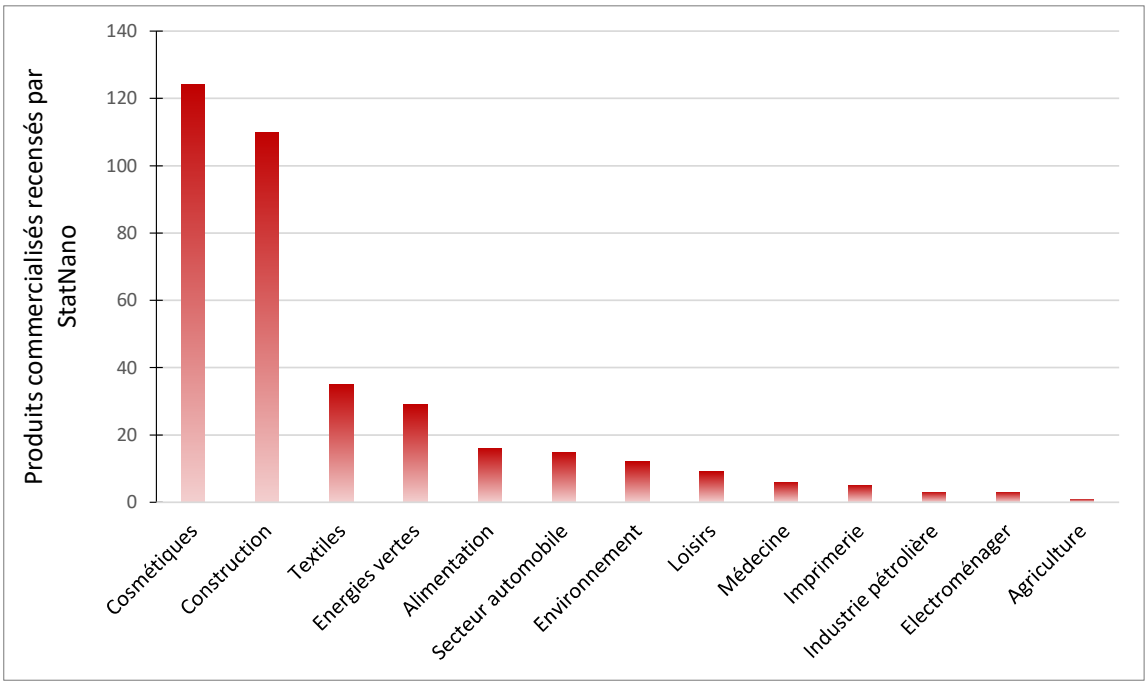


Figure 6. Recensement non exhaustif des utilisations commerciales de $nTiO_2$ déclarées par les fabricants (banque de données StatNano, consultées en 02/21).

4.2.1. Photoprotection

La capacité photoprotectrice du TiO_2 est principalement valorisée en cosmétologie, notamment dans les crèmes solaires. Le but est d'améliorer l'absorption des UV, tout en permettant l'étalement optimal d'un film photoprotecteur transparent, ce qui est permis lorsque la taille du $nTiO_2$ utilisé est inférieure à 30 nm. Les propriétés photocatalytiques du TiO_2 ont cependant besoin d'être inhibées afin d'éviter que les espèces réactives de l'oxygène (ERO) n'altèrent l'intégrité de la barrière cutanée, indispensable pour prévenir l'absorption des composés appliqués. Le $nTiO_2$ est donc généralement associé par dopage à d'autres substances, par exemple à l'aide d'un enrobage de dioxyde de silicium et d'alumine pour réduire l'activité photocatalytique de 99% de sa capacité initiale (Vance et al., 2015). D'autres techniques incorporent également des substances métalliques (manganèse, vanadium, chrome, fer...). Concernant son usage en tant que phytoprotecteur, la photoprotection des espaces de verdure a également été proposée par certains auteurs, comme en témoignent les dépôts de brevet associés à la pulvérisation de TiO_2 (protection des terrains de golf) employée comme filtre solaire dédié aux plantes (May, 2012).

4.2.2. Photocatalyseur

Sous certaines formes, le $nTiO_2$ possède une activité photocatalytique qui lui permet de décomposer une large variété de matières organiques (polluants, micro-organismes…) dont l'usage est valorisable dans le bâtiment, la remédiation (système de dépollution des sols, de l'air et des eaux) et dans l'agriculture. Les domaines du bâtiment et des travaux publics l'incorporent notamment pour ses propriétés autonettoyantes et anti-pollution (vitres, ciments, peintures…), afin de désorber les contaminants des surfaces exposées à la lumière solaire, par l'action oxydante du $nTiO_2$ grâce à son irradiation par les UV (Montazer and Seifollahzadeh, 2011). Il en résulte une production d'ERO, qui dégraderont les composés déposés sur les matériaux, qui seront ensuite lessivés par les eaux de pluie.

La remédiation est également un secteur en développement. Elle a pour but l'épuration, par destruction des polluants organiques contaminant le milieu aérien, aquatique, ou le sol. Pour ce faire, le $nTiO_2$ est irradié par illumination UV afin d'exercer une action oxydante visant à décomposer les éléments organiques en sous-produits de dégradation non toxiques. Les propriétés photocatalytiques du $nTiO_2$ peuvent être utilisées pour épurer les l'eaux contaminées en dégradant les composés organiques (pesticides, micro-organismes, résidus pharmaceutiques…) et il peut servir à réduire la toxicité de certains éléments ions métalliques (Chrome, Arsenic, Mercure, Sélénium) (Chowdhury et al., 2014). Cependant, ces procédés visant à abaisser la concentration de certaines molécules toxiques peuvent provoquer la formation de produits de dégradation. Il est donc important d'évaluer l'ensemble du cycle de vie de chaque polluant et de ses sous-produits de dégradation dans l'évaluation du risque sanitaire associé à ces nouvelles technologies.

Les capacités photocatalytiques du $nTiO_2$ permettent aussi de l'utiliser comme biocide à large spectre (bactéricide, virucide…), notamment lorsqu'il est dopé avec certains métaux (Fer, Argent), afin de proposer des composites oxydants très puissants pour désinfecter les surfaces, assainir l'air ambiant (Sung et al., 2011), ou bien pour synthétiser des films antimicrobiens (Dastjerdi and Montazer, 2010). Ces produits sont notamment utilisés dans les établissements hospitaliers, en particulier en remplacement des biocides confrontés aux phénomènes de résistances bactériennes.

4.2.2.1. Mécanisme

L'oxydation photocatalytique est fondée sur l'irradiation UV d'un semi-conducteur majoritairement composé d'anatase, ou bien dopé avec d'autres nanoparticules inorganiques (Figure 7). Ce semi-conducteur possède des électrons ayant la possibilité de prendre des valeurs d'énergie comprises dans certains intervalles, séparés par des bandes d'énergie interdites (Badli et al., 2017). Lorsqu'un photon correspondant à l'UV ($\lambda < 390$ nm) parvient au semi-conducteur avec une énergie supérieure ou égale à celle de bande interdite (3,2 eV), ceci permet à un électron de changer de bande de valence, créant une

lacune électronique, menant à la formation d'une paire électron-trou (e^-/T^+). En solution aqueuse, ces trous (lacunes électroniques) réagissent par oxydation avec l'eau (H_2O) ou l'ion hydroxyle (HO^-), à la surface du semi-conducteur pour former le radical $OH^\bullet$. Ce composé radicalaire nouvellement formé pourra provoquer l'oxydation des polluants étant adsorbés sur la surface du semi-conducteur. Le catalyseur est ainsi régénéré en fin de réaction et peut réagir cycliquement sans altération.

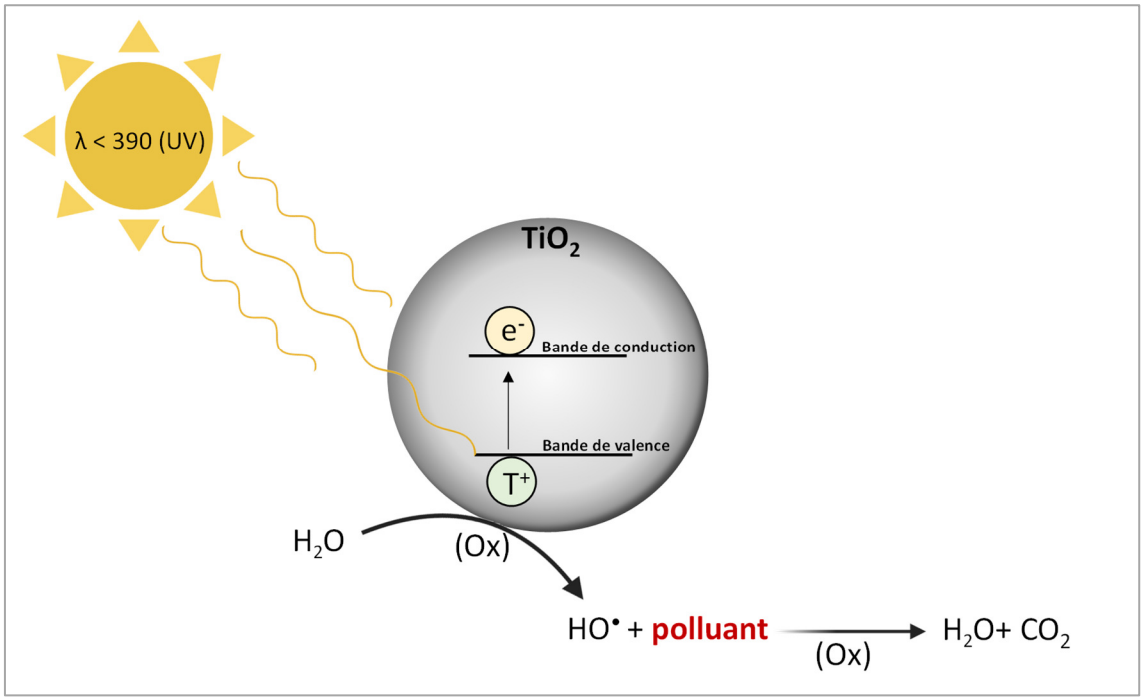


Figure 7. Illustration de la photocatalyse d'un polluant adsorbé à la surface du TiO_2 en phase aqueuse par activation UV. Cette dégradation est dépendante de la présence d'oxygène, d'un catalyseur et d'une illumination (λ = 365 nm). Illustration créée avec BioRender.com

4.2.2.2. P25 nTiO_2

Le Degussa (Evonik) P25, Aeroxide TiO_2, encore appelé TiO_2 P25, est composé d'une phase mixte nanocristalline de 75% d'anatase, et de 25% de rutile, dont les particules primaires mesurent environ 25 nm. Il est utilisé très largement pour ses propriétés de photocatalyseur, dont les effets ont été rapportés dans plus d'un millier d'articles de la littérature (Ohtani et al., 2010). Mais il peut être également utilisé comme agent biocide, et comme photoprotecteur s'il est dopé avec d'autre NM. En 2012, le National Institute of Standards and Technology (NIST), l'agence américaine promouvant le développement des technologies, de la métrologie et des standards industriels, a proposé ce NM comme particule

toxicologique de référence, ce qui en fait un NM modèle aux caractéristiques très bien décrites pour la recherche en nanotoxicologie.

4.2.2.3. Dégradation du Paraquat: un exemple de remédiation du $nTiO_2$

La photodégradation induite par le $nTiO_2$ émerge comme une méthode prometteuse de dégradation des pesticides pour son efficacité et son faible coût. Le rayonnement solaire et les transformations microbiologiques ne sont pas suffisants pour dégrader efficacement le paraquat (PQ) des sols et des eaux contaminés (Sartori and Vidrio, 2018). En fonction du type de sols, cet herbicide peut être adsorbé sur les particules, en particulier au contact de sols argileux (Singh and Singh, 2016). Dans ce contexte, les micro-organismes ne peuvent alors dégrader qu'une très faible part de PQ (<1%), et sa durée de vie peut atteindre plusieurs années (Pateiro-Moure et al., 2009). Cantavenera et al. (2007) ont démontré l'utilisation possible du $nTiO_2$ pour induire la dégradation de cet herbicide. En utilisant une suspension colloïdale de P25 $nTiO_2$ (0,4 g/L, pH 5,8) sous irradiation UV, la photocatalyse complète du PQ en phase aqueuse a été réalisée en 3 heures. De façon similaire, Badli et al. (2016) ont également dégradé en 4 heures 84% du PQ d'une solution aqueuse, en utilisant du $nTiO_2$ dopé au ZrO_2 (80:20) (0.3 g/L).

4.3. Le $nTiO_2$ dans l'agriculture et les biocides

4.3.1. Nanofertilisant

L'efficacité de la détoxification photocatalytique du $nTiO_2$ a également été étudiée à des fins phytosanitaires et/ou fertilisantes. Feizi et al. (2012) ont étudié la pousse du blé tendre (Triticum aestivum) en utilisant des concentrations croissantes en $nTiO_2$ (1 - 500 ppm). Ces nanoparticules ont permis une accélération de la germination des plants à 10 ppm, en comparaison des plantes non traitées, ou traitées au TiO_2 non nanoparticulaire. La pousse d'une espèce d'épinard (Spinacia oleracea) a également été promue par l'usage de la rutile nanoparticulaire en termes de germination, de contenu en chlorophylle et de taux de photosynthèse (Hong et al., 2005; Zheng et al., 2005). Le potentiel de l'anatase a également été évalué, en traitement des graines, et en pulvérisation sur les pousses des plantes. Une augmentation des taux de nitrates et des activités enzymatiques ont été mesurés (nitrate réductase, glutamate déshydrogénase, glutamate synthase…), ainsi qu'une optimisation de la croissance globale (augmentation du poids sec et humide) pour les deux types de nanoparticules testées (Yang et al., 2006). Également, un ensemble de fonctions ont été optimisées grâce aux capacités photocatalytiques du TiO_2 : l'absorption de la lumière par les plantes traitées, la régulation des niveau d'ERO, l'assimilation du gaz carbonique, la disponibilité en chlorophylle, phosphore et azote, le taux de photosynthèse et la germination.

Cependant, un taux important de $nTiO_2$ dans les sols pourrait affecter négativement les processus de nitrification des sols (production environnementale de nitrates), ce qui appauvrirait leur contenu nutritionnel (Simonin et al., 2016). Un état de l'art a également rapporté que les NM inférieurs à 50 nm pourraient pénétrer les plantes pour voie racinaire, par le feuillage, ou bien par les pores pour les NM hydrophiles (Lv et al., 2019), ce qui pourrait causer une accumulation dans certaines plantes, et mener potentiellement à une phytotoxicité. À l'inverse, certains auteurs ont observé que la présence de particules de TiO_2 (nanoparticulaires ou microparticulaires) à proximité des racines de plants de riz, pouvait prévenir la bioaccumulation des métaux lourds tels que le plomb, en le séquestrant dans le sol. D'une façon générale, le TiO_2 nanoparticulaire possède un bon potentiel en tant que produit phytosanitaire, car il n'induit *a priori* pas de phytotoxicité expérimentalement (aux doses inférieures à 1000 mg/kg) et il permet la promotion de la croissance de certaines cultures.

4.3.2. Nanopesticide

L'hypothèse majeure associée à l'effet du $nTiO_2$ en tant que pesticide (virucide, bactéricide, algicide, fongicide), est son activité oxydante induisant une formation d'ERO. Cette action est renforcée par son activité photocatalytique et l'efficacité globale de ce traitement apparaît comme étant plus importante que les traitements conventionnels. L'emploi du $nTiO_2$ sous forme d'anatase a été testé comme antiparasitaire. Il est capable d'exercer une activité acaricide sur les larves et les individus adultes chez deux espèces de tiques (Marimuthu et al., 2013). Un usage a également été rapporté en traitement curatif de la pourriture rouge et de la pourriture blanche (microchampignons détruisant le cellulose), maladies fongiques qui peuvent toucher un vaste nombre d'espèces végétales (De Filpo et al., 2013). Le potentiel antibactérien photocatalytique du $nTiO_2$ a été utilisé pour lutter contre des maladies associées aux tâches bactériennes des tomates et des roses (Paret et al. 2013). Un traitement de la vigne en conditions réelles a également été réalisé sur deux années consécutives (Fortune and Ogundeji, 2008). Le traitement au TiO_2 a permis de réduire la sévérité des infections des feuilles et des racines touchant la vigne (*Vigna unguiculata Walp*) et d'augmenter la production de 9 - 36% la première année, et de 10 - 51% la seconde. Cependant, même si les auteurs évoquent le $nTiO_2$, il n'est pas spécifié si la forme utilisée est nanoparticulaire ou non. En plus de ces avantages, le $nTiO_2$ peut aussi être utilisé afin de réduire la demi-vie des pesticides photodégradables, tel que l'imidaclopride ou l'avermectine (Guan et al., 2011) tout en maintenant leur efficacité. Il a également été utilisé comme photoprotecteur pour protéger la surface des feuilles des rayonnements UV (Vormberg et al., 2007) avec un objectif d'optimisation de rendement. Certains usages dédiés à des applications biocides du $nTiO_2$ ont été rapportés dans le Tableau 4. De façon notable, certains auteurs privilégient une biosynthèse de $nTiO_2$ à partir de micro-organismes, afin d'obtenir des formes considérées comme théoriquement biocompatibles (Marimuthu et al., 2013; Santhoshkumar et al., 2014).

Tableau 4. Exemple des utilisations du $nTiO_2$ comme biocides dans la littérature scientifique.

Usage	Forme	Organisme cible	Référence
Acaricide	Nanoparticules de $nTiO_2$ (10 nm)	*Rhipicephalus microplus* *Haemaphysalis bispinosa*	(Marimuthu et al., 2013)
Bactéricide	Nanoparticules de $nTiO_2$ (32 nm)	*Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*	(Santhoshkumar et al., 2014)
Bactéricide	Film mince de TiO_2 (anatase, épaisseur : ~ 100 nm)	*Pseudomonas aeruginosa*	(Amézaga-Madrid et al., 2003)
Fongicide	$nTiO_2$ (70 - 100 nm)	*Fusarium solani and Venturia inaequalis*	(Haghighi et al., 2012)
Fongicide	$nTiO_2$ à la surface d'un composite (prothèse dentaire)	*Candida albicans*	(Ahmed and Ali, 2018)

II. Problèmes sanitaires soulevés par les nanopesticides

Il existe une différence de perception importante des avantages et des inconvénients liés à l'émergence des NPe qui provoque une polarisation au sein de la communauté scientifique. Les chercheurs et les industriels impliqués dans le développement des pesticides voient une occasion unique de mettre en place des nouveaux produits plus efficaces et écologiques, qui suivent l'évolution des progrès réalisés sur la formulation des pesticides. Les NPe apparaissent alors comme une occasion de parer aux problèmes sanitaires et environnementaux des pesticides conventionnels. À l'inverse, la communauté des toxicologues perçoit le fait d'introduire volontairement des NM dans l'environnement comme un risque sanitaire potentiel, car les effets environnementaux et toxiques sur les organismes non-cibles des NPe sont encore méconnus. En définitive, ces visions opposées sont les deux revers d'une même médaille, dont le but est de permettre l'analyse de la balance bénéfice/risque associée à l'usage des NPe, qui pour l'heure manque cruellement de données. À notre connaissance, il n'existe pas encore de données toxicologiques sur l'être humain ou sur des modèles expérimentaux *in vivo*. Dans cette partie seront abordés les problèmes sanitaires soulevés par l'usage des pesticides et des NM, en se focalisant sur le système nerveux central (SNC), pour ensuite aborder la question de leurs effets cocktails possibles.

1. Impacts sanitaires des pesticides

1.1. Exposition

Même si la part attribuable à chaque voie d'exposition est encore méconnue (Andrew Clayton et al., 2003; Morgan et al., 2005; Pang et al., 2002), l'exposition aux pesticides peut se faire selon trois voies : par inhalation, par contact cutané ou par ingestion. Une exposition peut se produire directement dans le cadre professionnel (fabrication, utilisation, ou conditionnement), par un usage domestique (acaricide, insecticide…), ou bien indirectement par l'air, le contact de surfaces contaminées, ou via la consommation de denrées alimentaires contenant des résidus de pesticides. De nombreux corps de métiers autres que les agriculteurs sont concernés par l'exposition professionnelle : les personnes entretenant la voirie et les voies ferrées, les espaces verts, les terrains de sports, les personnes chargées de la désinsectisation, de l'hygiène publique ou des soins vétérinaires, les jardiniers et les paysagistes, ou encore les personnes travaillant dans le traitement des bois. Les sources d'exposition peuvent être variées. Elles peuvent avoir lieu à chacune des étapes de la manipulation du produit (transport, stockage, dilution, épandage…), lors du lavage des outils de travail, ou bien indirectement à cause de la contamination de la tenue de travail. Préalablement à l'utilisation du pesticide, une phase de préparation est souvent nécessaire. Elle est considérée comme critique, car c'est une étape où les substances toxiques sont les plus concentrées, et elle comporte un risque important d'exposition accidentelle. Les différentes phases pouvant mener à une exposition sont difficiles à évaluer de façon quantitative, car elles sont dépendantes des conditions de travail spécifiques à chaque travailleur (respect du port d'équipement de protection individuelle, conditions climatiques, type de produits utilisés, technique d'épandage etc.) (Baldi et al., 2014, 2012).

1.1.1. Voie cutanée

Elle est considérée comme pouvant être une voie majeure d'exposition chez les professionnels (Aprea et al., 2004; Baldi et al., 2014; Vitali et al., 2009). Elle dépend des caractéristiques physico-chimiques des substances impliquées, notamment leur caractère lipophile, pouvant leur octroyer la capacité à traverser l'épiderme. À ce titre, les solvants incorporés comme adjuvants dans les pesticides, ont une influence sur le passage transcutané, alors qu'ils ne sont que rarement pris en compte dans les études. Certaines études ont mesuré grâce à des dispositifs spécifiques, le dépôt de pesticides sur des échantillonneurs positionnés sur des combinaisons portées par des agriculteurs (Fenske, 1993). Cependant, ces méthodes ne reflètent pas les propriétés de rétention et d'absorption de la peau et les caractéristiques physiologiques individuelles (phototype, sudation, vasodilatation, lésions cutanées…). Cette voie peut néanmoins être négligée dans l'étude des produits fortement hydrophiles ne pouvant pas traverser l'épiderme.

1.1.2. Voie orale

Concernant la population générale, elle est considérée comme une source majeure. Elle est causée par l'ingestion d'aliments ou de boissons contenant des résidus de pesticides. Néanmoins, cette voie est contrôlée par les agences sanitaires afin de vérifier si les concentrations mesurées sont en accord avec les doses journalières admissibles (DJA) réglementaires. Un rapport publié par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) en 2018 synthétise les résultats obtenus au sein de l'Union Européenne (UE) en termes d'analyses conduites sur près de 85 000 échantillons de nourriture, pour lesquels 791 pesticides ont été recherchés. 96,2% des échantillons testés contenaient un ou plusieurs résidus de pesticides, mais ne dépassant pas les limites fixées par l'UE (European Union report on pesticide residues in food, 2018). Également, la voie orale inclut l'ingestion de poussières contaminées, spécifiquement chez les enfants en bas-âge ayant un comportement exploratoire, touchant les surfaces et portant les mains à la bouche. Pour les professionnels, elle peut être aussi liée au contact buccal, à l'onychophagie (rongement des ongles), à la prise alimentaire ou au tabagisme sur le lieu de travail.

1.1.3. Voie respiratoire

Contrairement à la voie alimentaire, il n'existe pas de dose réglementaire concernant les concentrations en pesticides dans l'air ambiant et l'exposition par voie aérienne est plus difficile à contrôler. L'exposition professionnelle aux pesticides par inhalation concerne notamment la pulvérisation des pesticides, générant des particules susceptibles de pénétrer dans les voies aériennes des travailleurs. Comme il n'existe pas d'obligation réglementaire relative à la surveillance des pesticides dans l'air, il est difficile de connaître précisément les niveaux d'exposition de la population générale. Pourtant, les niveaux d'imprégnation aux pesticides sont affectés par la proximité avec les lieux de cultures agricoles, qui peut provoquer une exposition résidentielle (Fréry et al., 2009). Dans les familles d'agriculteurs, des niveaux plus élevés de résidus de pesticides sont retrouvés dans les poussières de maison (Curl Cynthia L et al., 2002; Lu et al., 2000; Quandt Sara A et al., 2004) et dans l'urine des enfants (Loewenherz et al., 1997). Ces indicateurs montrent une corrélation entre l'imprégnation du domicile et de ses occupants, et la proximité des zones d'épandage. Aussi, une corrélation entre la détection des herbicides dans les poussières des logements, et la superficie des cultures autour du lieu de résidence a pu être mise en évidence (Ward Mary H. et al., 2006).

En France, les associations agréées de surveillance de la qualité de l'air (AASQA) réalisent depuis 2002 des mesures des résidus de pesticides dans l'air ambiant sur le territoire national. Cette campagne de mesure à grande échelle a mené en 2019 à la mise à disposition de la base de données Phytatmo au

public[5]. Au terme de ces 15 ans de récolte de données, cette étude a mis en évidence (1) entre 40 et 90 SA (herbicides, fongicides, insecticides) quantifiées de façon annuelle à l'échelle nationale, (2) une forte variabilité spatiale des concentrations associée à l'hétérogénéité du territoire (surfaces agricoles, types de culture, climat local etc.) montrant globalement que les zones densément urbanisées semblent moins exposées, (3) une saisonnalité importante des concentrations mesurées, qui correspondent notamment aux périodes majeures de pulvérisation des pesticides (printemps, automne). Par ailleurs, un bilan proposé par l'ANSES en 2010 (Exposition de la population générale aux pesticides, Anses 2010), a recensé plus de 100 000 mesures réalisées pendant 3 ans en milieu intérieur et extérieur. 12% des mesures ont abouti à la détection d'un pesticide, mettant en évidence la présence de 114 SA. Une corrélation a été mise en évidence entre les périodes d'utilisation des pesticides et les concentrations rapportées. De façon intéressante, l'exposition intervient également dans le milieu intérieur, où chacun passe environ 70% de son temps. À cause des traitements des matériaux aux produits insecticides ou antiparasitaires, la présence des pesticides dans l'air des logements a souvent été recensée, montrant parfois une contamination intérieure à des niveaux plus élevés que ceux mesurés dans l'air extérieur. Ces expositions chroniques peuvent être particulièrement problématiques pour les enfants en bas âge, qui constituent une population vulnérable en raison de l'immaturité de leur système immunitaire et respiratoire. En outre, ils sont exposés de façon plus importante aux poussières contaminées en raison de leur petite taille et de leur comportement main-bouche.

Airparif a mené une campagne de mesure à grande échelle pour analyser la présence de résidus de pesticides dans l'air extérieur sur deux sites de topographie distincte (Les pesticides dans l'air francilien - 2016). 72 pesticides ont été recherchés en Île-de-France dans deux sites caractéristiques. L'un citadin, dans le 18ème arrondissement de Paris, et l'autre rural (Bois-Herpin), dans une localité entourée de zones de grandes cultures céréalières. Les pesticides ont été détectés en zone rurale comme en zone urbaine et cette présence montre que ces composés peuvent être soumis à un transport atmosphérique sur de longues distances, à l'instar de la pollution atmosphérique aux particules fines. Les résultats de cette étude montrent que les concentrations mesurées sont très faibles : 82% des mesures étaient inférieures ou égales à 0,2 ng/m³ (plusieurs ordres de grandeurs sous la dose sans effet), bien que plus élevées en milieu urbain. Par ailleurs, une campagne nationale de mesures des résidus de pesticides dans l'air ambiant, pilotée par l'ANSES et l'INERIS, a montré que la population générale est exposée à des dizaines de substances, dont certaines classées cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques (Campagne Nationale Exploratoire des Pesticides dans l'air ambiant, ANSES 2020). Les résultats de cette vaste étude permettent un apport conséquent de données sur les niveaux d'exposition aux pesticides via l'atmosphère. Néanmoins, elle a souligné que le niveau des connaissances actuelles est largement insuffisant pour estimer le risque associé à l'exposition chronique à des mélanges à des faibles doses. Les auteurs précisent que ces lacunes sont liées à l'absence de donnée toxicologique sur les pesticides

[5] https://atmo-france.org/mise-a-disposition-de-15-annees-de-mesures-de-pesticides/

concernant la voie respiratoire, car la majorité des valeurs toxicologiques de référence disponibles ont été élaborées en utilisant uniquement des études par voie orale. En outre, l'extrapolation d'une voie d'exposition à une autre n'a pas été possible à cause de l'absence de donnée sur les paramètres toxicocinétiques des pesticides à la suite de leur inhalation. Ces résultats montrent la nécessité de porter une attention particulière sur l'étude toxicologique des pesticides par voie respiratoire.

1.1.3.1. Dispersion atmosphérique des pesticides

Lors de son utilisation, une fraction du pesticide pulvérisé est directement disséminée dans l'atmosphère par le phénomène de dérive (Figure 8). Secondairement, la fraction déposée sur le sol ou les plantes peut être également transférée vers l'atmosphère, soit par érosion éolienne (sous l'action du vent), soit par volatilisation (transfert vers l'aérosol atmosphérique). Par conséquent, une fraction des pesticides est dispersée dans l'atmosphère et n'atteint alors pas sa cible. En fonction des conditions de pulvérisation, certains auteurs ont estimé ces pertes entre 10% et 75% (Pimentel, 2005). Elles pourraient même atteindre 90% de la quantité appliquée, lorsque les pesticides sont très volatils et utilisés dans des conditions météorologiques défavorables, en termes de vent, de température, et d'humidité (Bedos et al., 2002).

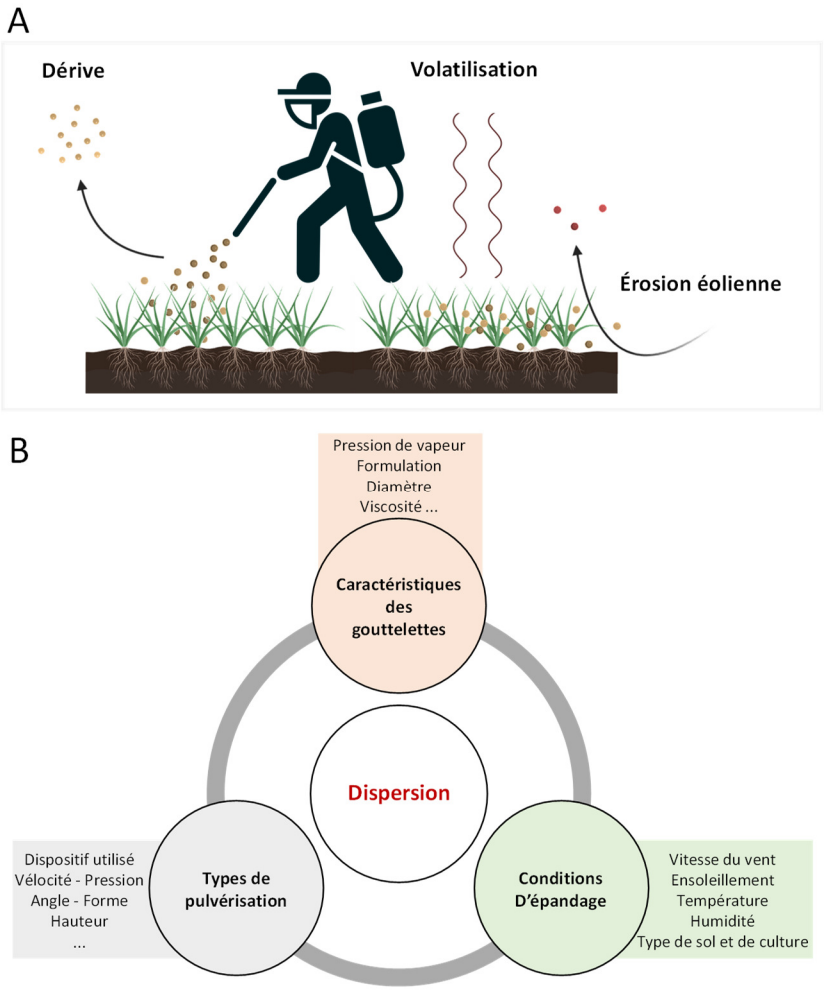


Figure 8. Dispersion atmosphérique des pesticides (A), par des phénomènes primaires (dérive) et secondaires (volatilisation et érosion éolienne). (B) Caractéristiques principales influençant leur phénomène de dispersion (Al Heidary et al., 2014; Guiral et al., 2016; Torrent et al., 2019). Illustration créée avec BioRender.com

a. Le phénomène de dérive

Le transfert des pesticides vers l'atmosphère, peut se faire directement pendant l'épandage, à cause du phénomène de dérive. Les gouttelettes produites lors de la pulvérisation subissent des changements de taille par fragmentation et évaporation en fonction des conditions météorologiques et des propriétés physico-chimiques du pesticide (volatilité, viscosité...). Lors de leur pulvérisation, la distribution en taille des gouttes varie de quelques µm à 600 µm en fonction du dispositif de pulvérisation, ce qui joue un rôle primordial dans cette dérive (Thèse A. da Silva, 2003). Si la petite taille des gouttelettes permet un meilleur traitement des cultures (pouvoir couvrant supérieur), elles seront néanmoins soumises à une dérive plus importante (Hilz and Vermeer, 2013). Les pertes sont donc très variables car modulées par

la taille des gouttelettes pulvérisées, le solvant utilisé, les conditions météorologiques, et le type d'outils de pulvérisation (rampe de pulvérisation, épandage manuel via pulvérisateur dorsal, épandage aérien…)(Coscollà et al., 2010).

b. La volatilisation

La volatilisation peut avoir lieu à partir de la surface traitée, du sol ou du couvert végétal, et représenter une partie importante de la dose appliquée pour les composés les plus volatils, par exemple comme la trifluraline (90% de la quantité appliquée). Elle peut durer plusieurs semaines après la pulvérisation et dépend principalement des propriétés physico-chimiques de la substance considérée (Bedos et al., 2002). Les gouttes pulvérisées les plus fines, de quelques µm, peuvent notamment s'évaporer rapidement (Coscollà et al., 2013, 2010). De plus, les composés semi-volatils se retrouvent essentiellement sous deux formes : une phase gazeuse, et une phase aérosol ou particulaire. Ils seront retrouvés en suspension dans l'air, la pluie et les brouillards. Leur devenir est influencé par leur distribution entre phase gazeuse (vapeur) et phase aérosol, sous forme de particules libres ou adsorbés sur d'autres composés atmosphériques. Les pesticides peuvent sédimenter ou être déposés au niveau du sol par les précipitations, aussi bien en tant que vapeur dissoute dans l'eau de pluie qu'en tant que particules. En outre, une fois dans l'atmosphère, les composés peuvent être altérés voire dégradés sous l'action des réactions chimiques atmosphériques ou sous l'action du rayonnement UV (Van Dijk and Guicherit, 1999).

c. L'érosion éolienne

Après leur pulvérisation, certains composés rémanents, c'est-à-dire ayant une demi-vie environnementale longue, peuvent s'être accumulés dans l'environnement en étant incorporés aux constituants minéraux ou organiques du sol. Les particules remises en suspension sous l'action du vent peuvent transporter ces résidus de pesticides dans l'atmosphère (Voutsas et al., 2005). Certains composés rémanents, comme l'heptachlore (0,75 à 2 ans) ou le diuron (300 jours), peuvent encore être retrouvés dans l'air ambiant malgré leur interdiction depuis plusieurs décennies (Campagne Nationale Exploratoire des Pesticides dans l'air ambiant, ANSES 2020). La contribution de cette voie est cependant mal connue, et l'utilisation illégale de certains pesticides pourrait expliquer en partie leur présence dans l'atmosphère (Coscollà et al., 2014), comme en témoigne la détection fréquente du lindane et de l'alpha-hexachlorocyclohexane, pesticides non-rémanents et interdits depuis des années.

1.2. Les effets neurotoxiques des pesticides

Les études toxicologiques et épidémiologiques indiquent qu'il existe un lien entre l'exposition professionnelle ou résidentielle aux pesticides et la prévalence de certaines pathologies, en particulier les cancers (INSERM, 2013), les pathologies neurologiques et les troubles de la reproduction. Par ailleurs, plusieurs pesticides ou leurs métabolites sont considérés comme des perturbateurs endocriniens. L'INSERM a donc été saisie par la direction générale de la santé pour effectuer un état de l'art sur cette question, qui a été publié en 2013 (INSERM, 2013). S'appuyant sur les articles publiés depuis les années 1980, cette étude a eu pour but d'établir un lien entre l'exposition professionnelle à certains composés et la survenue de pathologies spécifiques, en prenant en compte la cohérence entre les études épidémiologiques, les études toxicologiques, et l'existence d'une hypothèse mécanistique associée. Une présomption forte correspond à une convergence des données dans ces trois domaines d'études. Cette expertise est parvenue à la conclusion (Figure 9) qu'il existe une présomption forte entre l'exposition professionnelle à certains pesticides et certaines pathologies chez l'adulte, en particulier avec la maladie de Parkinson (MP) et certains cancers, celui de la prostate, le lymphome non hodgkinien et le myélome multiple. Ce rapport souligne également que les expositions professionnelles ou résidentielles au cours de la grossesse et au début de la vie post-natale, semblent être particulièrement à risque pour le développement de l'enfant. Une présomption forte de lien avec certaines pathologies a été rapportée concernant les malformations congénitales, les morts fœtales, l'altération du neurodéveloppement, le retard de croissance pondérale, les leucémies et les tumeurs cérébrales.

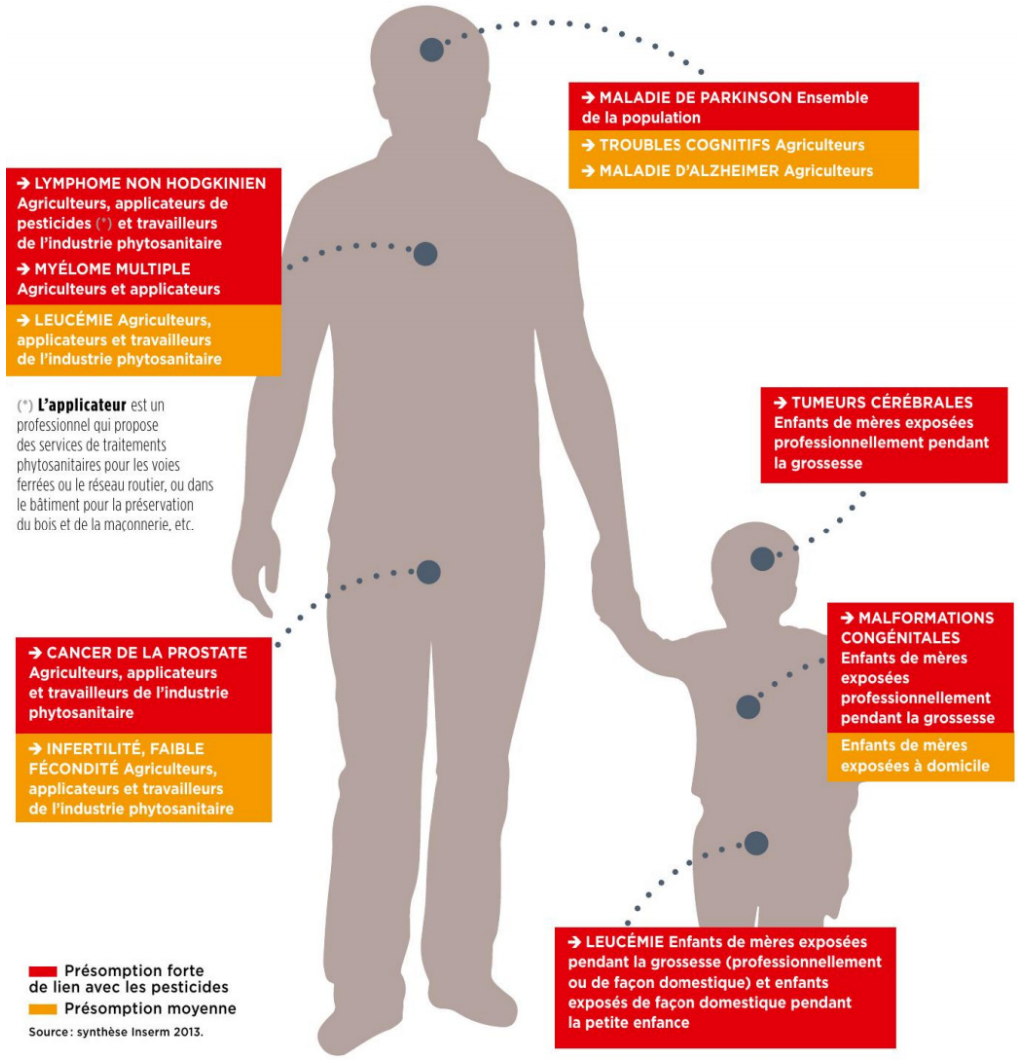


Figure 9. Conclusions de l'expertise INSERM 2013 sur les effets sanitaires des pesticides, infographie de Maryvonne Marconville (magazine la Recherche hors-série n°29, mars-avril 2019, illustration reproduite avec l'autorisation de la direction éditoriale).

Ces éléments montrent les conséquences neurotoxiques de certains pesticides, qui peuvent être expliquées en partie par l'analogie des mécanismes d'action de certaines substances sur le système nerveux central (SNC) des espèces cibles et non-cibles (Barouki, 2013) telles que l'être humain. Par exemple, certains pesticides de la famille des organophosphorés ou des carbamates peuvent cibler spécifiquement le SNC, en inhibant l'acétylcholine estérase, une enzyme clé pour le fonctionnement des synapses cholinergiques, ce qui provoque ainsi une accumulation toxique de l'acétylcholine (Sánchez-Santed et al., 2016). D'autres pesticides comme le paraquat (PQ) ou la roténone sont fortement suspectés d'être impliqués dans la survenue de la MP chez les agriculteurs. D'un point de vue épidémiologique, toxicologique et mécanistique, les données concernant la neurotoxicité du PQ sont probablement les plus concluantes de tous les pesticides. L'exposition professionnelle au PQ est en effet reliée à un risque

accru de développer la MP (Tanner et al., 2011) et cette substance est utilisée expérimentalement chez l'animal pour modéliser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette maladie.

L'étude des conséquences sanitaires des pesticides souligne la nécessité d'approfondir les connaissances des effets toxiques des pesticides (1) pendant les périodes de vulnérabilité, (2) en approfondissant les connaissances sur la toxicité des mélanges et des faibles doses, (3) en favorisant une recherche intégrant plusieurs approches.

(1) L'exposition professionnelle et résidentielle à certains pesticides pendant la grossesse peut affecter le développement *in utero* (croissance, cognition, malformations, etc.). Les conséquences potentielles sont insuffisamment évaluées durant la période prénatale, la petite enfance et la période pré-pubertaire, notamment en termes de neurotoxicité (INSERM, 2013).
(2) L'estimation du risque sanitaire reste fondée majoritairement sur les paramètres toxicologiques des SA seules. Or, les expositions sont chroniques, à des substances en mélange, pouvant donner lieu à des interactions toxicologiques non prévisibles. À ce titre, l'inhalation n'est que trop rarement prise en compte, alors qu'elle apparaît de plus en plus comme une voie d'exposition de premier plan (Campagne Nationale Exploratoire des Pesticides dans l'air ambiant, ANSES 2020).
(3) L'identification des mécanismes d'actions et des biomarqueurs d'effets *in vitro* ne suffit pas à prédire la survenue d'effets toxiques. Seule une approche intégrative de la réponse toxique, peut conduire à la prédiction des conséquences sanitaires chez l'homme, en anticipant les effets toxicologiques des substances à partir d'expériences *in vitro*, *in vivo* et *in silico*, pour faire le lien entre les propriétés d'une substance et ses effets toxicologiques (INSERM, 2013).

2. Impacts sanitaires des NM

L'augmentation rapide de la production et de l'utilisation des NM augmente le risque de rejet, de dispersion environnementale, et d'exposition involontaire à ces composés. Certains NM combinent à la fois une forte réactivité chimique et la capacité à pouvoir se disséminer dans les différents compartiments environnementaux (Boyes and van Thriel, 2020), ce qui soulève des inquiétudes sanitaires quant à leur pulvérisation volontaire dans le cadre d'une utilisation sous forme de NPe.

2.1. Dispersion environnementale

Les études réalistes concernant l'impact potentiel sur l'environnement des NM sont rares. Cependant, les cas où l'environnement est exposé de manière volontaire à des nano-produits existent déjà et il est prévisible qu'ils augmentent (Sun et al. 2014), notamment à cause du développement des nanofertilisants et des NPe. Également, les NM présentant une grande efficacité pour la remédiation des

écosystèmes contaminés aux métaux lourds, polluants organiques et substances biologiques (virus, bactéries, antibiotiques), sont utilisés pour le traitement des eaux usées, des déchets industriels ou de l'air (Khin et al., 2012).

Des obstacles méthodologiques renforcent la difficulté associée à leur détection et à la mesure de leurs concentrations dans des milieux environnementaux complexes (Cornelis et al., 2014). Afin de pouvoir estimer l'exposition aux NM, l'ensemble du cycle de vie (utilisation, usure, recyclage, destruction) des objets incorporant des NM et leur devenir dans l'environnement doivent être considérés. À ce titre, Sun et al. (2014) ont publié un article estimant les concentrations dans les différents compartiments environnementaux de cinq NM massivement utilisés (TiO_2, ZnO, Ag, NTC et les fullerènes). Grâce aux volumes de NM utilisés, leur secteur d'utilisation, leurs émissions, et les flux théoriques liant les différents compartiments, les auteurs ont réalisé une modélisation probabiliste des flux de NM en Europe, dont les nanoparticules de dioxyde de titane ($nTiO_2$) ressortent comme étant la première source de contamination. Malgré un tonnage de production 150 fois supérieur pour la forme non nanométrique, la concentration environnementale estimée de $nTiO_2$ serait inférieure de seulement un ordre de grandeur en comparaison de sa forme non nanoparticulaire. Ceci met en évidence l'importance primordiale des secteurs d'utilisation concernés (plus ou moins émissifs), du cycle de vie d'un NM et de son inertie environnementale, sur sa concentration finale. Les résultats concernant le $nTiO_2$ sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Prédiction des concentrations en $nTiO_2$ dans les pays de l'union européenne.

Compartiment environnemental	**Concentrations modélisées en $nTiO_2$**
Air	1 ng/m³
Eaux de surface	0,53 µg/L
Sédiments	1,9 mg/kg/an
Boues d'épandages (issues des stations épuration)	170 mg/kg
Sols naturels et urbains	0,13 µg/kg/an
Surfaces agricoles traitées aux boues d'épandage	1,2 mg/kg/an

Adapté de (Sun et al. 2014). En France, 73% des boues de stations d'épuration sont épandues sur les surfaces agricoles, ce qui est considéré comme une solution durable de valorisation de nos déchets (Deportes et al., 2018). Notons que les applications directes sous forme de nanofertilisants ou de NPe n'ont pas été prises en compte dans cette estimation. De plus, l'estimation de la production mondiale de NM reste encore mal évaluée, en particulier dans le cadre d'un usage agricole.

Les sources d'exposition aux NM comprennent à la fois l'exposition professionnelle et les rejets potentiels vers les populations résidant à proximité. Les NM proviennent de sources multiples (Figure 10), telles que les particules de la pollution atmosphérique, l'utilisation de produits de consommation incorporant des NM et de la remise en suspension dans l'air de la poussière contaminée. Dans le cadre d'un usage sous forme de NPe, la dérive potentielle des particules lors de leur production et de leur pulvérisation est à considérer en priorité. La contribution relative de ces sources est très variable par chacune des substances considérées ce qui rend l'évaluation de l'exposition globale d'autant plus difficile. Les principales voies d'exposition aux NM sont l'inhalation et l'ingestion (Oberdörster, 2010), l'absorption par voie cutanée s'avérant généralement négligeable (Larese Filon et al., 2015).

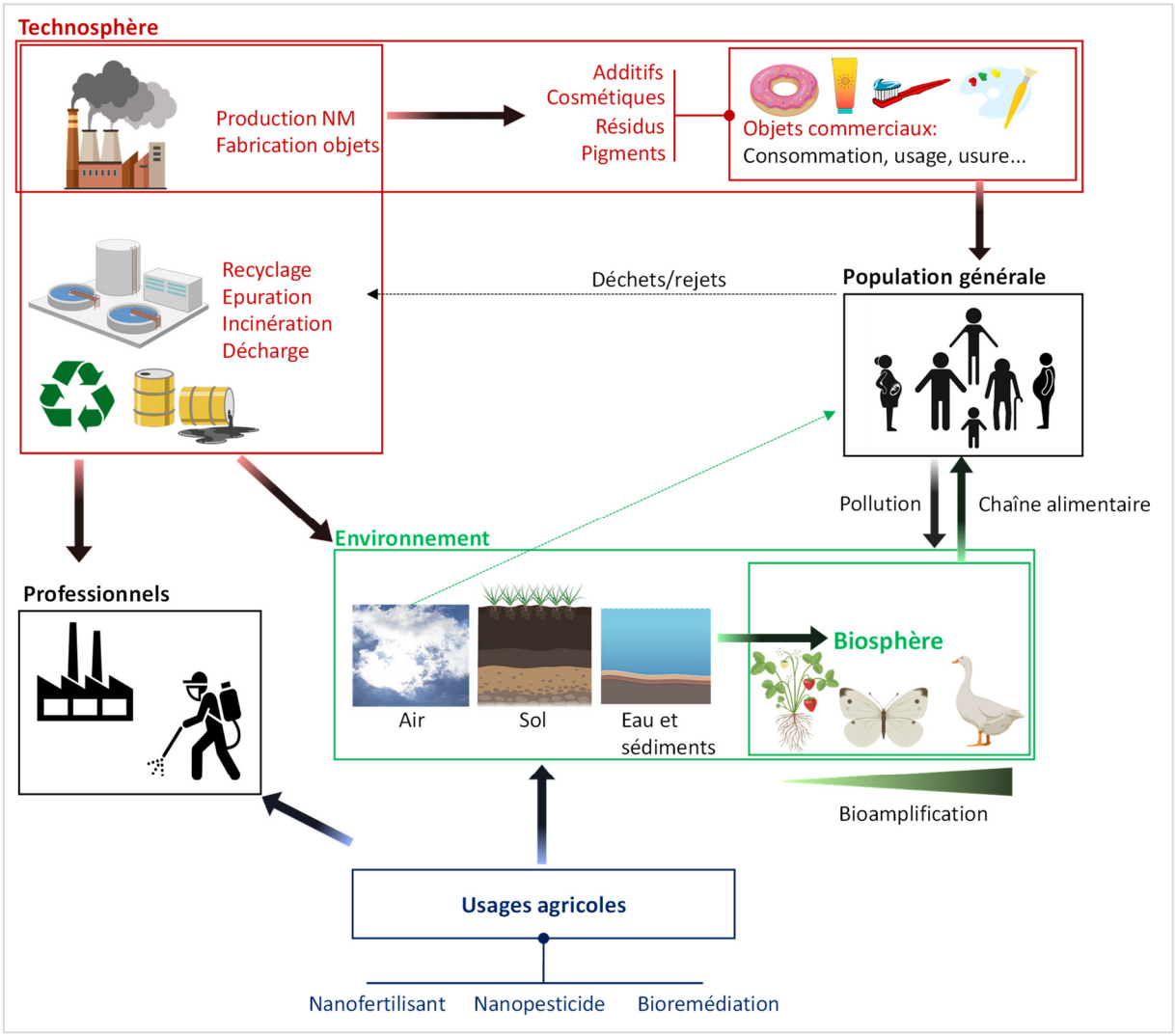


Figure 10. Les sources d'exposition aux NM manufacturés. Il est important de considérer la libération potentielle des NM dans un contexte professionnel et chez les consommateurs, tout au long de leur cycle de vie, couvrant sa fabrication, son utilisation et également son élimination. Les principales sources d'exposition sont d'origines professionnelles (utilisation directe, production, conditionnement…). Pendant leur cycle de vie, les NM peuvent être transférés vers tous les compartiments environnementaux. L'exposition peut avoir lieu via l'air et l'eau, ou en consommant des aliments qui en contiennent. Les contributions respectives de ces différentes voies sont difficiles à estimer. Toutefois, les trois voies d'exposition potentielles sont : l'ingestion de résidus, l'inhalation et la voie cutanée. Illustration créée avec BioRender.com

2.2. Effets écotoxicologiques

2.2.1. Spécificités des NM

Les inquiétudes sanitaires quant aux NPe sont liées majoritairement à la méconnaissance des NM associée à leur paramètres physico-chimiques, qui sont complexes et dynamiques au cours du temps (Cledón et al., 2015; Du et al., 2019; Handy et al., 2008). Ainsi, il n'est pas encore possible de modéliser leur capacité à traverser les barrières biologiques, leur devenir environnemental et les effets

toxicologiques qui en découlent. En outre, la dispersion environnementale de NM est susceptible d'altérer la qualité des écosystèmes et des sols (composition, pH, contenu microbiotique, disponibilité des nutriments…). Les NM capables de s'accumuler dans le sol sont susceptibles d'induire des effets indésirables sur le fonctionnement des micro-organismes par la formation d'ERO (Cledón et al., 2015). Il est également possible qu'ils puissent causer une potentielle vectorisation des polluants, par leur capacité à transporter certains composés, tout en séquestrant le contenu en nutriments des sols dans lesquels ils se trouvent. Aussi, des effets toxiques sur des micro-organismes, les espèces terrestres invertébrées, de mammifères, végétales et aquatiques ont déjà été rapportés pour certains NM (Ag, nanotube de carbone, fullerènes, TiO_2, CeO_2, Al_2O_3…) (Bondarenko et al., 2013; Handy et al., 2008). Par ailleurs, malgré une attention particulière portée aux NM inorganiques, la détection et la quantification de ces substances restent difficiles dans les milieux complexes (Kookana et al., 2014) tels que les différents compartiments environnementaux (air, eau, sol).

2.2.2. Bioaccumulation et bioamplification

Une attention particulière doit être portée sur les NM non-biodégradables, qui restent la majorité des NM décrits à ce jour. Ils peuvent être biopersistants et provoquer un phénomène de bioamplification au sein de la chaîne trophique, ce qui signifie une contamination croissante entre maillons de la chaîne alimentaire (des organismes producteurs vers les consommateurs), qui provoque *in fine* une bioaccumulation chez les organismes à haut niveau trophique (prédateurs et grands carnivores). Les travaux de Zhang et al. (2012) ont caractérisé une contamination de poires exposées à une solution de nanoparticules d'Ag en conditions de laboratoire, révélant que les nanoparticules ayant un diamètre autour de 20 nm peuvent pénétrer la peau et la pulpe du fruit au bout de 4 jours. Il a aussi été rapporté un exemple de transfert de $nTiO_2$ via la chaîne alimentaire chez les larves de papillons (Atrophaneura alcinous) ayant grandi sur une plante exposée au niveau racinaire aux $nTiO_2$ (Kubo-Irie et al., 2016). Les résultats ont montré la possible dissémination environnementale du $nTiO_2$ par les larves, notamment via leur excréta. Similairement, un transfert de nanoparticules d'or du plant de tabac chez le sphynx du tabac a également été observé (Judy et al., 2011). La quantité d'or mesurée dans le sphinx a été de 6,2 à 11,6 fois plus élevée que la quantité dans les feuilles de tabac, mettant en évidence une bioamplification de ces nanoparticules dans un maillon de la chaîne trophique. Un phénomène de bioaccumulation a aussi été rapporté pour des nanoparticules de $nTiO_2$ et de ZnO utilisées en traitement de plants de tomate (Raliya et al., 2015). Il a été montré une promotion du développement des plantes (biomasse, croissance, qualité des fruits) notamment grâce à l'usage par pulvérisation au niveau foliaire. Globalement, la possibilité d'un passage systémique des nanoparticules pourrait mener à leur bioaccumulation dans les plantes. Ces exemples illustrent la nécessité de considérer l'écosystème dans son ensemble pour estimer le risque sanitaire associé aux effets indirects de l'utilisation des NPe. Des essais en laboratoire ne

peuvent être suffisants pour estimer ce risque et il est nécessaire de s'assurer que les NM utilisés n'affectent pas les organismes non-cibles, la qualité et le contenu microbiotique des sols, ou la présence d'espèces symbiotiques indispensables au bon développement des plantes.

2.3. Paramètres toxicologiques

2.3.1. Absorption et distribution en réponse à l'inhalation de NM

L'inhalation est la principale voie d'exposition professionnelle aux NM manufacturés. Les études par inhalation ont montré que l'absorption par les voies respiratoires des NM est possible à la suite du franchissement de la barrière alvéolaire (Figure 11). Une fois passés dans le compartiment sanguin ou lymphatique, les NM peuvent se distribuer de façon systémique vers les différents organes (Kreyling et al., 2017b). L'arbre respiratoire est constitué de trois grandes parties : la région nasopharyngée, la région trachéobronchique et la région alvéolaire. Les particules inhalées peuvent s'y déposer en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et de l'état physiologique des voies aériennes considérées. En résumé, cette rétention des particules dans les poumons est d'autant plus importante que les particules sont situées dans une gamme de taille nanométrique (cf. chapitre 1, partie III.2.2.2.). Il existe majoritairement un dépôt des particules comprises entre 10 et plusieurs centaines de nm au niveau des voies aériennes inférieures, dans les alvéoles et les bronchioles respiratoires (Oberdörster, 2000). Ce dépôt, qui mène potentiellement à une accumulation particulaire, est d'autant plus important lorsqu'il existe une pathologie préexistante obstructive du poumon (asthme, broncho-pneumopathie obstructive…)(Kim and Kang, 1997). Également, à la suite d'une exposition aiguë par inhalation, l'accumulation des nanoparticules dans les organes secondaires semble limitée. Les dangers sont donc d'avantage liés à des expositions chroniques aux particules nanométriques (Kreyling et al., 2013).

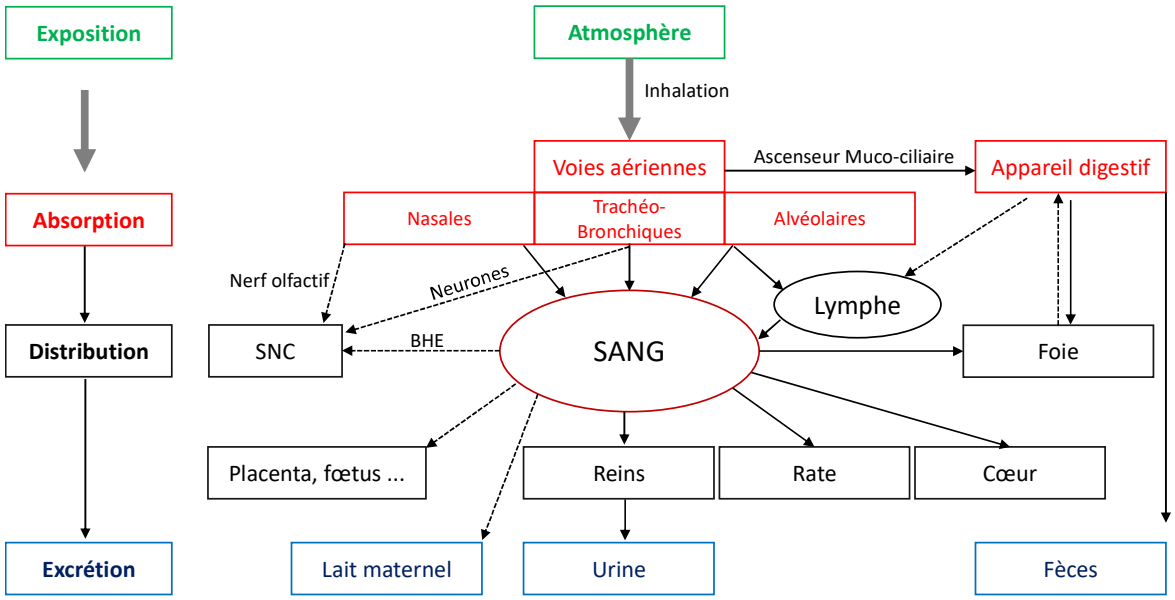


Figure 11. Toxicocinétique des NM après leur inhalation, adapté de (Oberdörster et al., 2005). Après inhalation, les particules peuvent s'accumuler sur leur site de dépôt, ou être transportées vers d'autres organes. La voie principale d'élimination concerne la clairance des macrophages, relocalisant les particules vers la voie digestive. La redistribution des particules vers l'interstitium, les ganglions lymphatiques et la circulation sanguine peut entraîner leur accumulation dans des organes spécifiques. Les nanoparticules peuvent migrer directement dans la circulation sanguine. Cette translocation est fonction des propriétés physico-chimiques et de surface des nanoparticules (formation de corona, charge, taille…). Le passage de la muqueuse olfactive vers le SNC via le nerf olfactif a également été suggéré comme voie d'entrée vers le SNC contournant la barrière hémato-encéphalique (BHE).

2.3.2. Passage vers le système nerveux central

Bien que protégé de l'exposition aux xénobiotiques par la barrière hémato-encéphalique (BHE), le cerveau peut potentiellement être atteint par les NM inhalés selon deux grandes voies. Certains NM peuvent traverser la BHE pour atteindre le parenchyme cérébral de façon directe par le captage via les terminaisons nerveuses présentes dans les fosses nasales (terminaisons des neurones du nerf olfactif et du nerf trijumeau), ou de façon indirecte via le compartiment sanguin (Figure 12). Ainsi plusieurs régions du cerveau peuvent être atteintes en fonction des voies considérées (Bencsik et al., 2018 ; Ibanez et al., 2014 ; Schaefer et al., 2002). D'autres mécanismes moins bien décrits pourraient également provoquer une translocation cérébrale, comme ceux impliquant les nerfs périphériques. De façon notable, le passage cérébral est facilité au cours du neurodéveloppement où la BHE n'est pas pleinement fonctionnelle. Par ailleurs, l'intégrité de cette BHE peut être altérée au cours du vieillissement ou à la suite de conditions neuroinflammatoires pathologiques. Les concentrations tissulaires de NM détectées dans le cerveau restent le plus souvent faibles, ce qui témoigne d'une protection relativement efficace des barrières physiologiques protégeant l'intégrité du SNC. Néanmoins, après leur translocation cérébrale, les études suggèrent que la clairance des NM est longue, ce qui pourrait ainsi provoquer un

phénomène de bioaccumulation perturbant l'homéostasie cérébrale (Boyes and van Thriel, 2020; Kreyling, 2016; Nel et al., 2006).

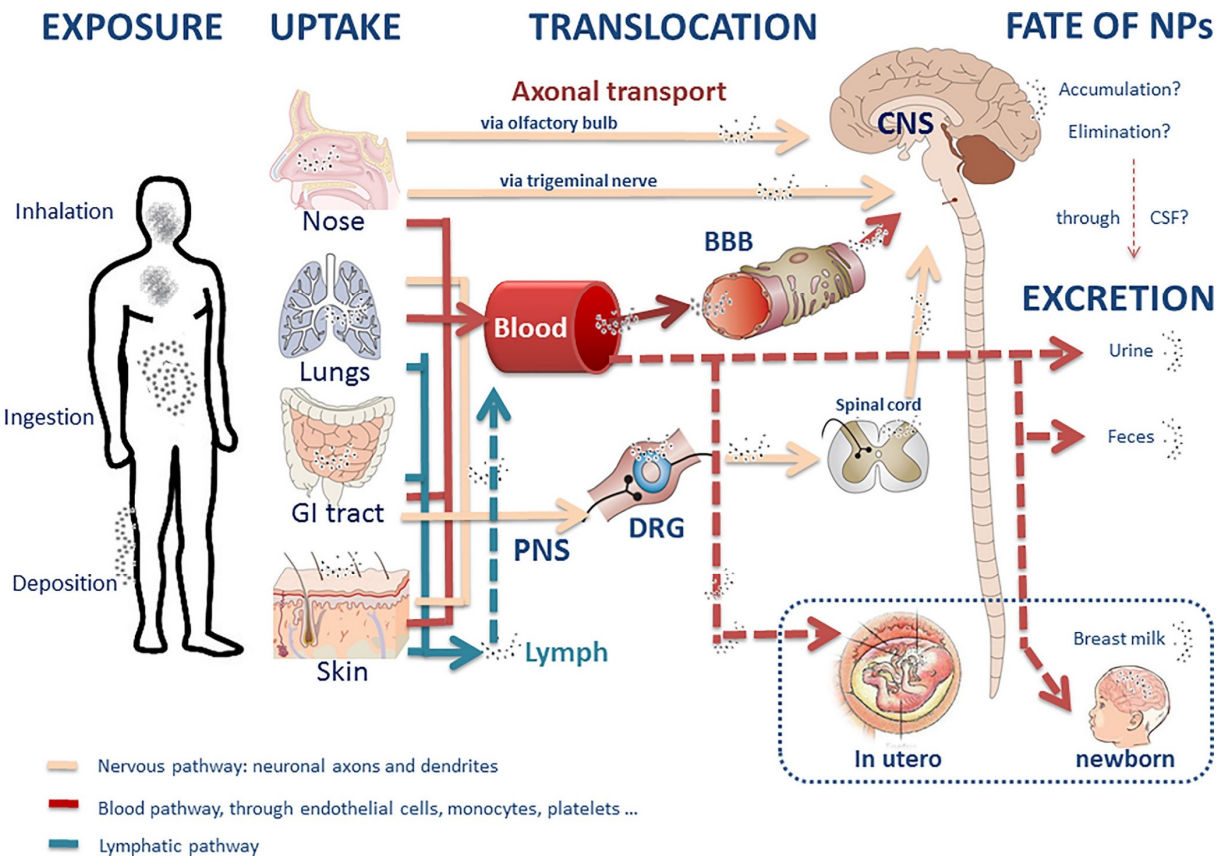


Figure 12. Translocation des NM vers le SNC en fonction des scénarios d'exposition. Un passage direct est possible depuis la muqueuse nasale vers le cerveau, via le transport axonal empruntant les neurones sensoriels olfactifs et le nerf trijumeau, pouvant rejoindre les régions du cerveau rostrales (comme les bulbes olfactifs) et caudales comme le tronc cérébral. Les différents stades de la vie (fœtal, juvénile et adulte) impliquent des voies d'exposition spécifiques, dont l'exposition aux NM par la lactation pour le nouveau-né, et le passage de la barrière placentaire pour le fœtus. Issue de (Bencsik et al. 2018).

Via les neurones sensoriels olfactifs et le nerf trijumeau, les particules déposées dans la cavité nasale peuvent potentiellement traverser la barrière épithéliale pour être internalisées au sein du SNC, en court-circuitant donc la BHE. Ces réseaux d'interaction entre structures nerveuses impliquent par conséquent un transport possible des NM dans des régions cérébrales cibles différentes.

Par ailleurs, l'exposition orale du nouveau-né pourrait potentiellement avoir lieu via le lait maternel (Morishita et al., 2016), même si cette voie est encore peu étudiée. À ce titre, notons que certains auteurs ont mesuré des effets neurotoxiques du $nTiO_2$ potentiellement induits par une exposition via la lactation

(Gao et al., 2011). Toutefois, ces résultats sont encore lacunaires car les nouveau-nés pourraient avoir été exposés non seulement par le lait maternel mais aussi par contact avec leur mère.

2.3.3. Clairance pulmonaire

Il existe plusieurs types de mécanismes d'élimination des particules déposées dans les voies aériennes (Figure 13). Après leur inhalation, les particules sont soit exhalées, soit déposées dans les différentes parties de l'appareil respiratoire, comprenant les voies aériennes supérieures (fosses nasales, bouche, pharynx et larynx) et inférieures (arbre trachéo-bronchique, alvéoles pulmonaires) (Donaldson et al., 2008). La première ligne de défense est physique, elle permet la capture des composés solubles dans le mucus revêtant les parois aériennes. Elle est commune à l'ensemble des voies respiratoires à l'exception des alvéoles pulmonaires. Dans les voies aériennes inférieures, les composés solubilisés peuvent migrer dans le tissu conjonctif sous-jacent dans l'interstitium pulmonaire, ou bien être absorbés par les cellules voisines. Elles sont également susceptibles d'être transloquées vers la circulation sanguine ou lymphatique.

L'ascenseur muco-ciliaire permet une épuration rapide des éléments de la zone trachéobronchique et nasopharyngée, durant entre 24h et 48H chez l'être humain en fonction du site de dépôt (Kreyling et al., 2002). Elle est assurée par les cils de l'épithélium bronchique qui battent de façon synchrone pour former un mouvement liquidien ascendant vers le carrefour aérodigestif. Les particules et composés déposés dans le mucus remontent alors jusqu'au pharynx où ils sont soit expectorés, soit déglutis, ce qui mène à leur relocalisation vers le système digestif. Ils y seront soit rejetés via les fèces, soit réabsorbés par l'intestin. Il est à noter que l'efficacité de la clairance muco-ciliaire décroît progressivement dans la partie distale des poumons, au fur et à mesure que l'on s'approche des alvéoles pulmonaires.

La dernière ligne de défense concerne les éléments déposés dans les alvéoles, qui sont alors pris en charge par les macrophages alvéolaires. Les particules insolubles comme le $nTiO_2$ sont internalisées par les macrophages, qui peuvent ensuite emprunter l'ascenseur muco-ciliaire. Ils peuvent également résider dans les alvéoles, ou se loger dans l'interstitium pulmonaire où ils resteront séquestrés. La demi-vie pulmonaire des particules peut-être très longue. Elle peut ainsi atteindre environ 700 jours chez l'être humain (Oberdörster et al., 2005), ce qui est dix fois supérieur à la durée décrite chez le rat. Par ailleurs, la taille et l'état d'agglomération des particules modulent grandement leur demi-vie alvéolaire, ce qui mène possiblement à leur rétention et leur accumulation pulmonaire. En outre, la capacité d'épuration des macrophages est amoindrie face aux NM, car l'efficacité de la phagocytose est d'autant plus faible que les particules sont petites (Semmler et al., 2004). Cette clairance alvéolaire diminuée peut provoquer un état inflammatoire chronique par accumulation des particules, causant ainsi une pneumotoxicité sur le long terme qui peut provoquer ou aggraver une pneumopathie préexistante.

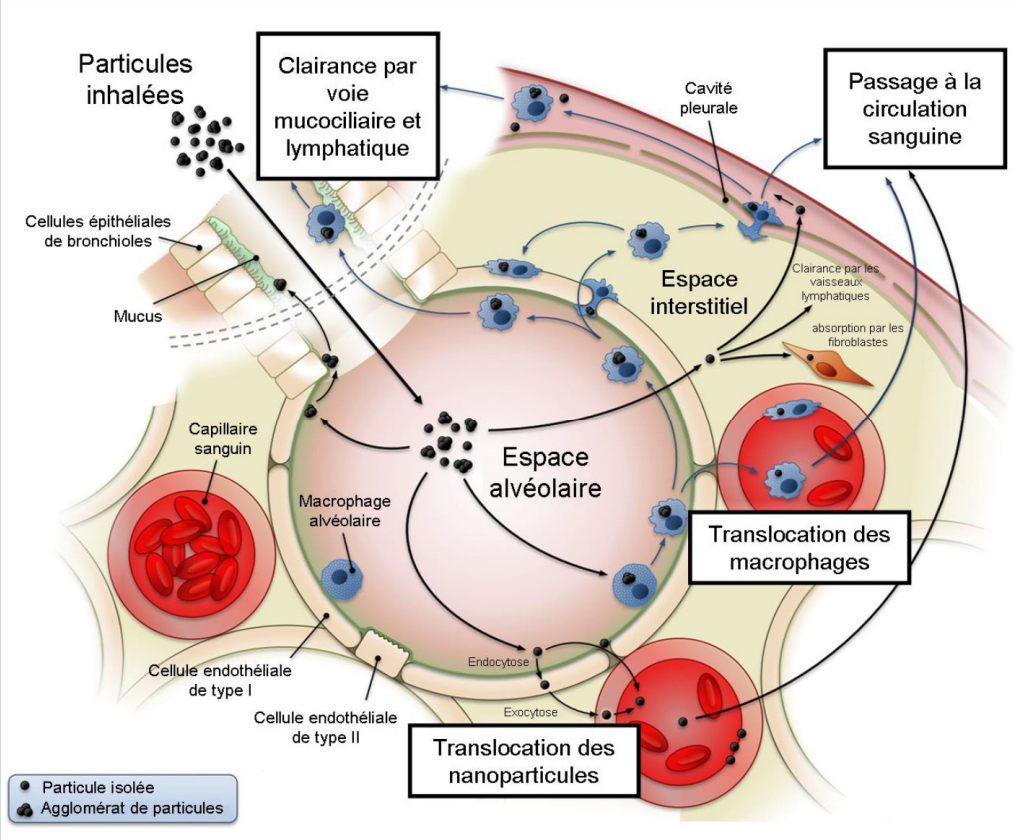


Figure 13. Mécanismes de clairance pulmonaire et de translocation des particules déposées dans les voies aériennes inférieures. Image issue de (Stone et al., 2017), adaptée par (Bernal-Meléndez, 2019). L'immunité pulmonaire est un équilibre entre le maintien de l'homéostasie et l'efficacité de la réponse inflammatoire à la suite de l'activation des macrophages alvéolaires. La non-résolution du signal inflammatoire initial ayant causé le recrutement des cellules immunitaires, peut mener à l'installation d'un état inflammatoire chronique, délétère pour les tissus.

2.3.4. Mécanismes de toxicité

Il existe beaucoup d'études *in vitro* et *in vivo* sur un grand nombre de NM différents dans la littérature. Malgré des méthodes variées et une caractérisation des NM souvent lacunaire, certains invariants peuvent être résumés ici. En effet, leur toxicité sur différents types cellulaires et sur différentes espèces animales a été largement démontrée, notamment via l'induction d'un stress oxydant, d'une inflammation et d'une potentielle génotoxicité. Également, il a été souligné le rôle central de la corona, cet ensemble de composés qui se forme par adsorption de biomolécules sur les NM (Lundqvist et al., 2008).

2.3.4.1. Interactions avec la corona protéique

C'est un phénomène bien décrit pour les nanoparticules, qui peuvent adsorber à leur surface de nombreux composés depuis leur synthèse jusqu'à leur rencontre avec un système biologique. Ces interactions de surface constituent une modification de leurs propriétés physico-chimiques en comparaison des particules nues (Ritz et al., 2015), qui provoque la formation d'une couronne, ou « corona » par adsorption de protéines, de lipides et de glucides présents dans les fluides biologiques. Cet ensemble dynamique et complexe de composés, contrôle le devenir des nanoparticules en devenant l'interface avec les systèmes biologiques. Par exemple, les cellules et leurs récepteurs membranaires peuvent entrer en contact avec la couronne de protéines mais pas avec la surface de la nanoparticule, car elle ne leur est plus accessible. En fonction de la force du lien entre cette couronne et la nanoparticule, on distingue la corona rigide ou « hard corona » (interaction forte, lien irréversible) et la corona souple ou « soft corona » (interaction faible). La corona souple permet des échanges dynamiques avec le milieu environnant et confère une capacité de transport à la nanoparticule. Cet effet appelé « cheval de Troie » a été utilisé pour décrire le fait que les nanoparticules peuvent se déplacer masquées en évitant la phagocytose. D'autre part, elles peuvent être internalisées par endocytose par les cellules bronchiques et les pneumocytes, ce qui peut déclencher la production de radicaux libres dans l'épithélium des voies aériennes et induire la libération de médiateurs pro-inflammatoires (Hussain et al., 2009). Certains auteurs considèrent même que la corona occuperait un rôle toxicologique plus important que les propriétés des nanoparticules nues (Durán et al., 2015).

2.3.4.2. Stress oxydant et inflammation

Les ERO sont naturellement présentes dans les cellules en tant que sous-produits du métabolisme aérobie. Elles comprennent notamment l'anion superoxyde ($^{\bullet}O_2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) (Figure 14). Ce sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, ce qui leur confère une forte réactivité (Cross et al., 1987). Elles sont essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire, en contribuant à la signalisation et à certains processus biologiques (par exemple l'activité NAD(P)H oxydase des cellules phagocytaires) (Finkel, 2011). Les différents tissus ont une sensibilité différente aux ERO en fonction de la nature chimique des ERO, de leur concentration, et de leur métabolisme (type cellulaire, métabolisme aérobie, niveau des défenses antioxydantes…). L'apparition d'un stress oxydant pourra avoir lieu si la production des ERO est incontrôlée et/ou s'il existe un déficit des systèmes de défenses antioxydantes.

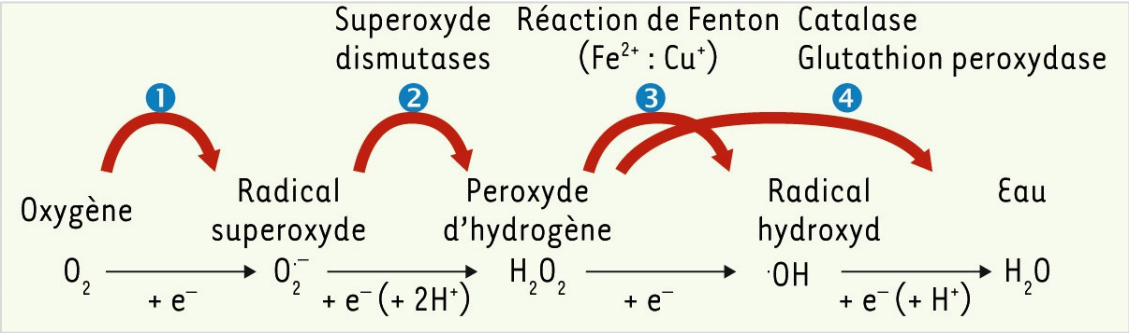


Figure 14. Les espèces réactives de l'oxygène et la défense antioxydante. Adapté de (Migdal and Serres, 2011). Les défenses antioxydantes peuvent être induites par les concentrations d'ERO. La production de l'anion superoxyde est régulée par les superoxydes dismutases (SOD), des métalloenzymes catalysant sa dismutation en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène peut former, via la réaction de Fenton, le radical hydroxyle. La quantité de peroxyde d'hydrogène est elle-même régulée par la catalase (CAT) qui provoque sa dismutation en eau, ou par la glutathion peroxydase (GPx) qui catalyse sa réduction en utilisant la forme réduite du glutathion. Le glutathion (GSH pour sa forme réduite) est un tripeptide présentant un groupement thiol, qui possède un fort pouvoir réducteur. En tant qu'antioxydant le plus abondant dans les cellules, il constitue une ligne de défense majeure. La régénération de sa forme réduite utilise le NADPH, qui sert également à la réduction de nombreux autres antioxydants (Murphy, 2015). Les niveaux de ces défenses antioxydantes sont en général dérégulés à la suite de l'exposition aux NM.

La toxicité des NM, notamment celle des nanoparticules d'oxydes métalliques, est principalement due à une génération importante et continue d'ERO (Li et al., 2015), qui provoque l'oxydation non spécifique des composés cellulaires (Carrière et al., 2006), pouvant conduire à une altération fonctionnelle (réversible) ou lésionnelle (irréversible) des tissus. Une production excessive d'ERO causera une baisse progressive des capacités de défenses antioxydantes, une peroxydation lipidique, des dommages protéiques et/ou génomiques, qui ensemble provoqueront une induction de l'inflammation renforçant l'effet toxique des NM. Les conséquences sont extrêmement variables selon la dose, la durée d'exposition, et le type cellulaire considéré (baisse de la fluidité membranaire, anomalies des récepteurs, fibrose, dépôts de lipides, apoptose neuronale, etc.). En outre, le stress oxydant et l'inflammation sont associés à la survenue de nombreux phénomènes biologiques (Manke et al., 2013) comme les pathologies chroniques chez l'homme (cancers, malformations développementales, maladie neurodégénérative etc.). C'est le mécanisme le plus couramment décrit dans les effets des NM, il est mis en lumière par une diminution de la forme réduite du glutathion associée à une augmentation des réponses antioxydantes cellulaires par l'activation de la voie Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2).

2.3.4.3. Influences des caractéristiques physico-chimiques des NM

Les NM peuvent générer des ERO par des mécanismes différents, de façon intrinsèque ou par interactions avec les cellules. Les propriétés physico-chimiques des NM déterminent leurs propriétés

toxicologiques, qui ont été évaluées par des études réalisées très majoritairement chez le rongeur, et synthétisées dans plusieurs états de l'art (Bakand and Hayes, 2016; Buzea et al., 2007; Buzea and Pacheco, 2019; Oberdörster et al., 2005). Certains paramètres décrits comme étant déterminants dans les effets toxicologiques des NM sont rapportés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Exemple de paramètres physico-chimiques des NM liés à leurs effets biologiques.

Caractéristiques physico-chimiques	**Effets biologiques**
Morphologie Distribution en taille	Translocation au travers des barrières biologiques Internalisation cellulaire Efficacité de la phagocytose Durée de rétention (bioaccumulation)
Forme cristalline Surface spécifique Caractéristiques de surface	Modulation de la réactivité et de la cytotoxicité Cotransport d'autres xénobiotiques (vectorisation) Adsorption de composés (endogènes ou exogènes) Composition de la corona Potentiel oxydant - Stress oxydant Inflammation Génotoxicité
Pureté Composition chimique	Potentiel oxydant - Stress oxydant Inflammation
Charge Solubilité	Absorption Distribution Bioaccumulation Excrétion
État d'agglomération/agrégation	Capacité à être phagocyté Rétention au lieu de dépôt

2.3.5. Les propriétés toxicologiques du $nTiO_2$

2.3.5.1. Toxicocinétique

a. Voie respiratoire

La translocation du $nTiO_2$ à travers la barrière alvéolaire est un phénomène menant à sa distribution systémique, puis à sa potentielle accumulation dans certains organes (Gaffet et al., 2018). À ce titre,

plusieurs études expérimentales ont pu la démontrer chez le rat. Oberdörster et al. (1992) ont montré que la rétention du $nTiO_2$ dans l'interstitium pulmonaire dépend de la taille des NM inhalés (12,21, 230 et 250 nm). Plus récemment, Kreyling et al. (2017) ont exposé des rats à du $nTiO_2$ radiomarqué par instillation intratrachéale. Ils ont mis en évidence qu'une fraction de 30 à 50% des particules se dépose dans les voies respiratoires, et qu'une fraction d'environ 30% se dépose au niveau alvéolaire, provoquant la phagocytose par les macrophages alvéolaires. Ils ont également souligné qu'une fraction d'environ 4% est capable de passer la barrière alvéolo-capillaire, et que la clairance macrophagique est d'autant moins efficace que les particules sont de petite taille, ce qui augmente donc la persistance des nanoparticules en comparaison des particules plus grosses. Leur distribution est également systémique, le TiO_2 s'accumulant dans différents organes : en particulier le foie, la rate et le squelette où il peut persister pendant au moins 28 jours.

Le $nTiO_2$ peut être excrété par deux voies, via les urines ou par les fèces. Xie et al. (2011) ont suivi les concentrations en Ti radiomarqué dans les organes de souris exposées par injection intraveineuse. Une accumulation dans la rate et le foie a été mesurée, ainsi qu'une excrétion majoritairement urinaire, suggérant la prédominance d'une clairance rénale. Geraets et al. (2014) ont procédé à des injections répétées chez le rat, qui ont mené à l'estimation d'une persistance biologique du TiO_2 durant jusqu'à 90 jours. Au contraire de la première étude, le TiO_2 n'était pas détecté de façon significative dans les urines et les fèces. À notre connaissance, l'élimination du $nTiO_2$ via la sueur et le lait maternel n'a pas été analysée.

Concernant la translocation cérébrale, il a été montré dans plusieurs études un passage possible du sang vers le SNC à la suite d'injections de $nTiO_2$ chez la souris (Jeon et al., 2011; H. Liu et al., 2009; Ma et al., 2010). Liu et al. (2009) ont par exemple observé une accumulation majoritairement dans le foie et les reins, suivis de la rate, des poumons puis du SNC. De façon similaire, Kreyling et al., (2017) ont observé un faible cérébral passage à la suite d'une exposition orale chez le rat, mais associé à une clairance plus longue en comparaison des autres organes. Ces études illustrent la possibilité d'une translocation faible du $nTiO_2$ vers le SNC en traversant la BHE. Dans le cas de l'inhalation du $nTiO_2$, il existe des inquiétudes quant au passage potentiel vers le SNC, soit depuis l'épithélium nasal via la translocation par le nerf olfactif vers le cerveau, ou bien indirectement par un premier passage systémique suivi de la traversée de la BHE. Une étude a mis en évidence un passage possible via la voie olfactive de $nTiO_2$ administré de façon répétée par voie intranasale chez la souris (Wang et al., 2008). Cette procédure a conduit à une augmentation des concentrations de titane dans les bulbes olfactifs, le cortex, l'hippocampe et le cervelet, dont les concentrations étaient dépendantes du temps (après 15 instillations réparties sur 30 jours). Également, ces concentrations dépendaient de la taille des particules et de la région du cerveau considérée. Les plus petites nanoparticules (80 nm) étaient associées à une concentration tissulaire plus élevée dans l'hippocampe, tandis que les autres durées testées (2, 10 et 20 jours) ont montré une concentration plus élevée dans les bulbes olfactifs (Wang et al., 2008). Il est

important de noter la quantité remarquablement importante de $nTiO_2$ utilisée lors de cette étude (jusqu'à 7,5 mg de $nTiO_2$ par souris instillés au niveau nasal).

b. Voie digestive

Cette voie est également importante à prendre en compte car l'inhalation des particules mène aussi à une exposition secondaire via leur relocalisation vers le tractus digestif. Chez le rongeur, les études ayant évalué la toxicité aiguë par voie orale, ont établi que le $nTiO_2$ est faiblement toxique (dose sans effet > 1 g/kg/jour, [Warheit et al., 2015]). Cho et al. (2013) ont montré que la concentration en TiO_2 sanguine n'était pas plus élevée en cas d'administration orale massive (jusqu'à 1042 mg/kg/jour) chez le rat, en comparaison du groupe témoin, suggérant qu'un passage au travers de la barrière intestinale n'avait pas lieu. Wang et al. (2013) ont montré un faible taux d'absorption dans l'épithélium gastro-intestinal du $nTiO_2$ pendant 30 jours (75 ± 15 nm ; anatase, doses de 0, 10, 50, 200 mg/kg), mais une absence de migration vers la circulation sanguine.

Par ailleurs, deux publications majeures ont souligné des effets préoccupants du TiO_2 sur l'intestin, ainsi qu'une possible perturbation du microbiote intestinal. Bettini et al. (2017) ont exposé des rats au TiO_2 (additif alimentaire E171, comprenant une fraction nanoparticulaire) par gavage à 10 mg/kg/jour pendant une semaine, ou via l'eau de boisson pendant 100 jours. Ils ont observé une accumulation dans l'épithélium, couplée à un passage de la barrière intestinale. D'après cette étude, l'exposition a induit une réponse inflammatoire après 100 jours, ainsi que l'apparition de lésions épithéliales intestinales. Kreyling et al., (2017) ont également mis en lumière un passage de la barrière intestinale pour une faible fraction du $nTiO_2$ ingéré (diamètre médian : 70 nm), représentant 0,6% de la dose délivrée par instillation œsophagienne, qui s'est distribuée dans la majeure partie des organes après 7 jours (foie, poumons, reins, cerveau, rate, utérus et squelette). D'une façon générale, les données ne sont pas consensuelles concernant cette voie d'exposition, mais il ressort que le $nTiO_2$ n'est que faiblement absorbé au travers de la barrière intestinale.

2.3.5.2. Toxicité expérimentale

Les études *in vivo* analysant les effets du $nTiO_2$ lors d'expositions par voie pulmonaire (instillation intratrachéale ou intranasale, inhalation) ont montré une toxicité exacerbée du $nTiO_2$ en comparaison du TiO_2 micrométrique à concentration équivalente. L'induction d'un stress oxydant a été observée par une diminution des défenses antioxydantes intracellulaires, une peroxydation lipidique, une production d'ERO et une altération de l'expression des gènes de la réponse au stress (Shi et al., 2013). Ces effets toxiques ont aussi été mis en évidence par la recherche d'effets systémiques (influence sur le poids), de modifications des paramètres sanguins (marqueurs hépatiques, rénaux, immunologiques…) et par une

élévation des marqueurs de l'inflammation (Sang et al., 2012). Les ERO sont libérées par les cellules inflammatoires et par la surface réactive des particules, en provoquant une altération de l'homéostasie des tissus pulmonaires. Une inflammation a été rapportée dans un grand nombre d'études utilisant des expositions aiguës ou chroniques. Les particules de $nTiO_2$ étant biopersistantes et peu solubles, elles sont faiblement phagocytées par les macrophages alvéolaires, et elles tendent à s'accumuler dans les poumons au cours des expositions successives. Si la clairance particulaire est inefficace, le processus inflammatoire ne peut pas stopper le signal l'ayant initiée, provoquant ainsi une inflammation persistante qui renforce la toxicité pulmonaire du $nTiO_2$ (Kawasaki, 2017). Également, en cas d'exposition prolongée et importante, la capacité de clairance peut être dépassée (surcharge pulmonaire), entraînant des lésions tissulaires pulmonaires et une prolifération des cellules épithéliales. L'étendue de l'inflammation varie selon le type de $nTiO_2$, avec une toxicité plus élevée de la forme anatase en comparaison de la rutile. Plusieurs modalités d'exposition sont souvent rapportées, mais les expositions chroniques semblent les plus pertinentes pour décrire un scénario d'exposition réaliste, car il est peu probable que l'on puisse être exposé de façon aiguë au $nTiO_2$ en dehors du cas d'un accident industriel.

La génotoxicité du $nTiO_2$ est encore controversée. Le rapport de la Commission européenne[6] sur le TiO_2 a examiné les études publiées entre 2010 et 2015 recensant l'usage de différents types de $nTiO_2$ (en termes de taille, cristallinité, revêtement…). En conclusion, 93 études sur 170 ont mené à des résultats significatifs qui indiquaient une génotoxicité. Mais une seule étude *in vivo* s'est révélée positive sur les six examinées et considérées comme fiables. La génotoxicité du TiO_2 serait donc plutôt une conséquence secondaire de l'inflammation et du stress oxydant, produisant indirectement des lésions oxydatives de l'ADN.

2.3.5.3. Evaluation de la toxicité sur l'être humain

Plusieurs études épidémiologiques portant sur le TiO_2 ont été réalisées en milieu professionnel. Une étude multicentrique a observé une légère surmortalité par cancer pulmonaire (Boffetta et al., 2004), mais il n'a pas été trouvé d'effet de la durée ou des concentrations en TiO_2 sur la mortalité. À ce jour, les études épidémiologiques ne suffisent pas à prouver un lien entre une exposition aux particules de TiO_2 et la survenue du cancer du poumon chez l'être humain. En raison de preuves suffisantes issues de l'expérimentation animale mais de données contradictoires chez l'homme, le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) a classé le TiO_2 (quelle que soit la taille) dans la catégorie « possiblement cancérogène pour les êtres humains » (2B) dans son évaluation publiée en 2010 (IARC Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans). En revanche, les études épidémiologiques portant sur la fabrication et la manipulation de plusieurs NM (impliquant le $nTiO_2$), convergent pour mettre en lumière

[6]https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)28&docLanguage=En

des modifications de marqueurs biologiques clés induits par l'exposition aux NM (Liou et al., 2015), en termes de stress oxydant, de fonction pulmonaire (atteinte de la capacité pulmonaire, marqueurs de fibrose, inflammation locale), d'inflammation (augmentation systémique des cytokines pro-inflammatoires) et de marqueurs d'effets cardiovasculaires.

Dans son rapport publié récemment sur l'exposition professionnelle au $nTiO_2$, l'ANSES préconise une valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) de 0,80 µg/m³ permettant de prévenir la survenue d'effets pulmonaires[7]. Cette recommandation provient des données produites chez l'animal, ayant mis en évidence une concentration maximale n'entraînant pas d'effet néfaste sur les poumons (encore appelée *No Observed Adverse Effect Concentration*, NOAEC) de 0,5 mg/m³ chez le rat et de 2 mg/m³ chez la souris. À titre de comparaison, la VLEP recommandée aux Etats-Unis est de 0,3 mg/m^3 pour le $nTiO_2$ depuis 2011[8]. Par ailleurs, le règlement CLP 2020/217 (Classification, étiquetage et emballage des substances) adopté en octobre 2019, classe officiellement le TiO_2 comme cancérogène 2 par inhalation[9]. Cette classification s'applique uniquement aux mélanges sous forme de poudre contenant au minimum 1% de TiO_2 en masse, se présentant sous forme de particules ou de composites ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm. En outre, pour la forme P25 du $nTiO_2$, l'ANSES recommande une valeur toxicologique de référence (VTR) chronique par inhalation de 0,12 µg/m^3. Cette valeur correspond à la dose n'entraînant pas d'effet néfaste sur les populations exposées à l'échelle de la vie entière.

3. Le système nerveux, une cible potentielle des pesticides et des NM

3.1. Un domaine de recherche hérité de l'étude de la pollution particulaire de l'air

De façon notable, peu d'études se sont penchées sur l'impact possible des NM par inhalation sur le SNC, en dépit du fait que le cerveau puisse être directement exposé, comme évoqué précédemment. Pourtant, l'actualité scientifique la plus récente a souligné l'impact sanitaire possible associé à la pollution atmosphérique liée aux particules ultrafines. Par exemple, une étude a montré que les nanoparticules de magnétite présentes dans la pollution atmosphérique particulaire peuvent être détectées dans des échantillons de cerveaux humains, soulignant leur translocation possible vers le SNC à la suite de leur inhalation (Maher et al., 2016). Chez l'être humain, les effets neurotoxiques de l'inhalation particulaire ont pu être mis en évidence chez les individus résidents dans les villes à l'air le plus pollué, dans différentes régions cérébrales telles que les bulbes olfactifs, le cortex frontal et la substance noire (SN), révélés par la survenue d'une inflammation systémique et d'une

[7] https://www.anses.fr/fr/content/dioxyde-de-titane-sous-forme-nanoparticulaire-recommandation-de-valeurs-limites-d'exposition
[8] https://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf
[9] https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R0217&from=EN

neuroinflammation, associés à une accumulation des marqueurs caractéristiques de la maladie Alzheimer (de plaques bêta-amyloïdes) et de la MP (corps de Lewy et alpha-synucléine) (Calderón-Garcidueñas et al., 2011, 2008, 2003). Ces différents marqueurs de stress neurotoxique étaient également associés à une altération de la BHE (Calderón-Garcidueñas et al., 2013).

Au niveau expérimental, chez le chien exposé à de fortes concentrations de pollution particulaire d'origine urbaine, certaines régions cibles du SNC (muqueuse olfactive, bulbe olfactif, cortex frontal) présentaient un gradient de lésions tissulaires et d'accumulation de métaux (nickel et vanadium) suggérant la voie nasale comme voie d'entrée cérébrale majeure (Calderón-Garcidueñas et al., 2003). De façon similaire, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson se caractérisent par des lésions débutant initialement au niveau des bulbes olfactifs et des noyaux centraux, et elles sont associées à des déficits olfactifs (Block and Calderón-Garcidueñas, 2009). Plusieurs arguments fondés sur des données histopathologiques, de neuro-imagerie, de tests cognitifs et d'études épidémiologiques aussi bien chez l'homme que chez l'animal convergent vers un lien possible entre l'exposition à des NM et les maladies neurodégénératives. Par conséquent, la présence croissante de NM dans des produits manufacturés, notamment dans les NPe, pose la question de leurs éventuels effets sanitaires, en particulier sur le fonctionnement cérébral (Bencsik et al., 2018; Bencsik and Lestaevel, 2021).

3.2. Le cerveau, un organe complexe à l'homéostasie fragile

Le SNC est un organe unique par sa complexité, qui présente une plus grande sensibilité au stress oxydant que les autres organes (Figure 15). Ceci est dû à la convergence de plusieurs facteurs (Gerlach et al., 2006): un métabolisme important du dioxygène (environ 20% de la consommation du corps humain), un contenu en fer élevé (production potentielle de radicaux par réaction de Fenton) en particulier dans la SN, la présence importante de lipides gras insaturés cibles de la peroxydation des ERO, et une activité amoindrie des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion réductase (GR). Étant donné les capacités de régénération très limitée du SNC, il est important de considérer à la fois le potentiel de bioaccumulation cérébrale des NM lors d'expositions répétées, ainsi que leur neurotoxicité au cours du temps. Ceci est d'autant plus critique lorsque la BHE est immature (lors du neurodéveloppement), ou endommagée (altération par des toxiques, influence du vieillissement) (Disdier et al., 2017).

Deux revues récentes recensent les principaux effets neurotoxiques observés pour les NM manufacturés (Bencsik et al., 2018; Boyes and van Thriel, 2020). Il a été démontré que certains NM altèrent la fonction neuronale (Z. Liu et al., 2009; Ziemińska et al., 2014), provoquent la génération d'un stress oxydant (Afeseh Ngwa et al., 2011; He et al., 2018; Zhang et al., 2011), pouvant mettre en jeu une apoptose neuronale et l'activation des cellules microgliales. Par ailleurs, un effet majeur de l'exposition aux nanoparticules est le déclenchement d'une neuroinflammation persistante, mise en

évidence par l'expression de cytokines et l'activation des cellules microgliales, qui peuvent entrainer à long terme des dommages irréversibles sur le fonctionnement nerveux. D'autres fonctions peuvent être altérées par les NM, telles que la transmission inter-neurones via une modification de l'activité électrique ou chimique (Bencsik et al., 2018). Au-delà des modifications cellulaires et tissulaires, l'exposition cérébrale aux NM peut se traduire par des modifications comportementales, mnésiques et motrices traduisant l'altération fonctionnelle de réseaux neuronaux spécifiques (Strickland et al., 2016).

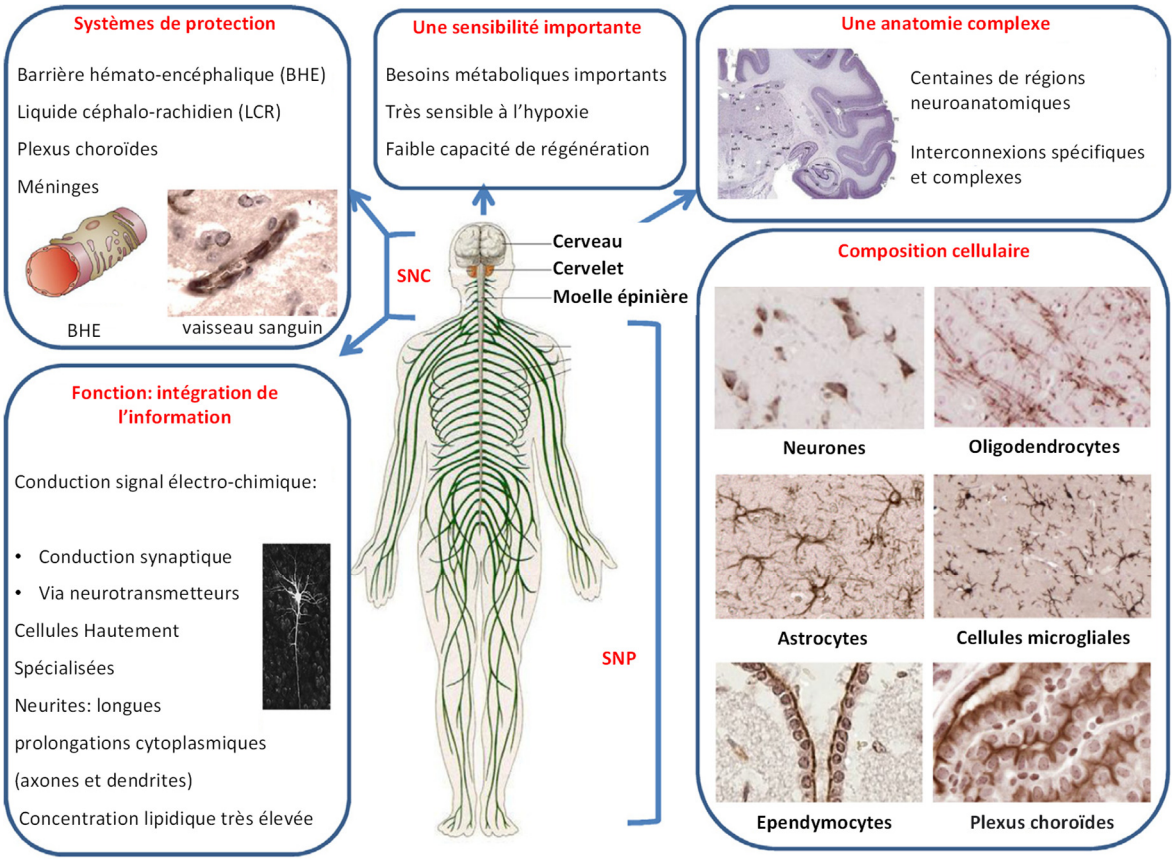


Figure 15. Caractéristiques du système nerveux, adapté de (Bencsik et al. 2019). Il est composé du système nerveux périphérique (SNP) et du système nerveux central (SNC), le SNC comprenant le cerveau et la moelle épinière. Il est constitué de deux types cellulaires: les neurones et les cellules gliales. Les neurones sont des cellules excitables dédiées au traitement et à la transmission de l'information nerveuse via des signaux électro-chimiques, la transmission se faisant par l'intermédiaire des neurites, pour être échangée au niveau des synapses. Les dendrites reçoivent l'information, laquelle est convertie via des récepteurs protéiques et transmise au corps cellulaire du neurone, tandis que l'axone, joue le rôle d'émetteur de l'information. Les cellules gliales comprennent plusieurs populations cellulaires majoritaires: les astrocytes, les cellules microgliales et les oligodendrocytes, assurant respectivement un support trophique et énergétique, un rôle immunitaire et la myélinisation des axones. Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du SNC, qui composent la première ligne de défenses cérébrales, elles coordonnent les réactions inflammatoires consécutives à des lésions du SNC et elles ont une influence majeure dans la pathogenèse des neuropathies. Les phénomènes d'astrogliose et de réactivité microgliale décrivent la réponse des astrocytes, ou des cellules microgliales, en réponse aux stimuli de menace de l'intégrité du SNC.

Les altérations tissulaires du SNC peuvent se cumuler au cours du temps (Jayaraj et al., 2017), ce qui demande donc la mise en place d'études privilégiant l'utilisation de protocoles d'exposition chronique. En outre, les évènements clés cellulaires et tissulaires de toxicité sont modulés par la susceptibilité génétique et les facteurs liés au mode de vie d'une personne, et l'ensemble de ces éléments peut aboutir au développement de maladies neurodégénératives au cours du temps. L'évaluation du potentiel neurotoxique des NM implique principalement l'exploration (1) de signes neurocomportementaux tels que les changements dans l'apprentissage, la mémoire, la motricité, la coordination et les réflexes, les phénomènes de tremblements et la paralysie, (2) de marqueurs biochimiques tels que la synthèse, la libération et l'absorption des neurotransmetteurs, (3) des signes neurophysiologiques et neuroanatomiques objectivables par l'analyse histologique, protéomique ou transcriptomique (Sachana and Hargreaves, 2018; Teleanu et al., 2019).

3.3. Neurodéveloppement : une phase critique

Le placenta est la barrière biologique fœtale assurant l'intégrité du développement au cours de la gestation. Certaines études ont montré que les nanoparticules en général pouvaient interférer avec son bon fonctionnement et donc qu'elles pouvaient représenter un risque pour le fœtus (Hawkins et al., 2018). Lors d'une exposition maternelle à un NM, il est possible que celui-ci soit distribué de la circulation sanguine maternelle vers le fœtus s'il peut traverser les barrières biologiques (placenta, barrière alvéolaire, barrière hémato-encéphalique…). Le passage placentaire provoque potentiellement une accumulation dommageable dans certains organes du nourrisson en fonction des caractéristiques physico-chimiques du composé. Or, la phase développementale est une période critique, qui permet à l'organisme de s'adapter aux variations environnementales afin de maintenir son intégrité. Cette plasticité est importante durant la période de vie *in utero* et durant le début de la vie post-natale. Elle correspond à une phase de différenciation et de multiplication cellulaire essentielle au développement des tissus. De plus, l'intégrité des barrières biologiques, la machinerie enzymatique nécessaire au maintien de l'homéostasie (enzyme du métabolisme des xénobiotiques, défenses antioxydantes etc.) et le système immunitaire ne sont pas encore pleinement fonctionnels pour parer efficacement à l'action des toxiques (Eskenazi B and Castorina R, 1999).

Plusieurs études dans lesquelles des rongeurs ont été exposés durant la gestation ou à des stades précoces, ont montré des effets neurodéveloppementaux du $nTiO_2$ sur la progéniture. Les ratons exposés *in utero* (exposition des mères par voie orale à 100 mg/kg/j durant la gestation) présentaient des concentrations accrues de titane, une prolifération cellulaire réduite dans l'hippocampe et des performances altérées aux tests comportementaux évaluant la mémoire et l'apprentissage (Water Morris Maze et tâches d'évitement) jusqu'au 60ème jour de vie post-natale, montrant donc un effet durable de l'exposition durant la gestation (Ebrahimzadeh Bideskan et al., 2017). Chez la souris ayant reçu des

concentrations considérées comme faibles de $nTiO_2$, (1, 2 ou 3 mg/kg/j), du début de la gestation jusqu'au sevrage (21ème jour de vie post-natale), des lésions des cellules pyramidales de l'hippocampe et un amincissement du cortex cérébral et cérébelleux ont été observés, ainsi qu'une diminution de la densité neuronale, de l'apprentissage et de la mémoire (Hong et al., 2018). Ces déficits ont été liés à des altérations de l'expression de la famille des protéines Rho, qui sont impliquées dans le développement, le maintien et le fonctionnement du système nerveux ainsi que dans certaines maladies neurologiques telles que la MP.

Le dépôt de particules dans les voies respiratoires peut déclencher une inflammation pulmonaire et la libération systémique de composés pro-inflammatoires, induisant indirectement une réponse neuroinflammatoire à cause d'une activation microgliale prolongée (Jayaraj et al., 2017). Par ailleurs, il a été montré un déclenchement possible de réactions inflammatoires placentaires (Hawkins et al., 2018), empêchant celui-ci de jouer son rôle de soutien durant le neurodéveloppement, ce qui peut provoquer des altérations persistantes sur le cerveau de la progéniture. Par conséquent, les nanoparticules inhalées peuvent exercer des effets neurotoxiques ou neurodéveloppementaux à distance de leur cible toxicologique sans avoir à passer préalablement les barrières biologiques, en particulier celles persistantes pouvant s'accumuler et provoquer une réponse inflammatoire prolongée.

La phase développementale est extrêmement sensible aux perturbations induites par les facteurs environnementaux (xénobiotiques, carences nutritionnelles, infections…) pouvant provoquer un stress cellulaire. Les altérations ayant lieu durant cette période peuvent mener au développement d'une pathologie se manifestant de façon différée au cours de la vie d'un individu (Barouki et al., 2012; Junien et al., 2016). Une altération neurodéveloppementale peut donc prédisposer un individu à la toxicité d'une exposition secondaire survenant ultérieurement, favorisant ainsi les mécanismes physiopathologiques associés aux maladies neurodégénératives (Heusinkveld et al., 2016). Ainsi, les fenêtres d'exposition critiques représentées par les stades précoces, comme le stade fœtal, doivent être prises en compte de façon prioritaire dans l'étude de la neurotoxicité des NM émergents jugés préoccupants.

3.4. Mécanismes d'action d'un NM neurotoxique

Les évènements mis en jeu dans la neurotoxicité des NM peuvent être décrits sous la forme d'une séquence causale d'évènements clé dits «adverse outcome pathways», (ou AOP), qui décrivent les différentes échelles mises en jeu dans l'effet neurotoxique des NM (Figure 16). Dérivant de l'étude des produits chimiques conventionnels, ces AOP apparaissent comme un nouveau cadre essentiel pour prédire l'incidence des pathologies à l'échelle de l'individu ou des populations, dérivant des effets observés au niveau moléculaire et cellulaire (Edwards et al., 2016). Cet outil permet l'évaluation de la neurotoxicité associée aux NM en reliant les évènements clés observés pour une certaine concentration donnée, avec une conséquence pathologique (Boyes and van Thriel, 2020).

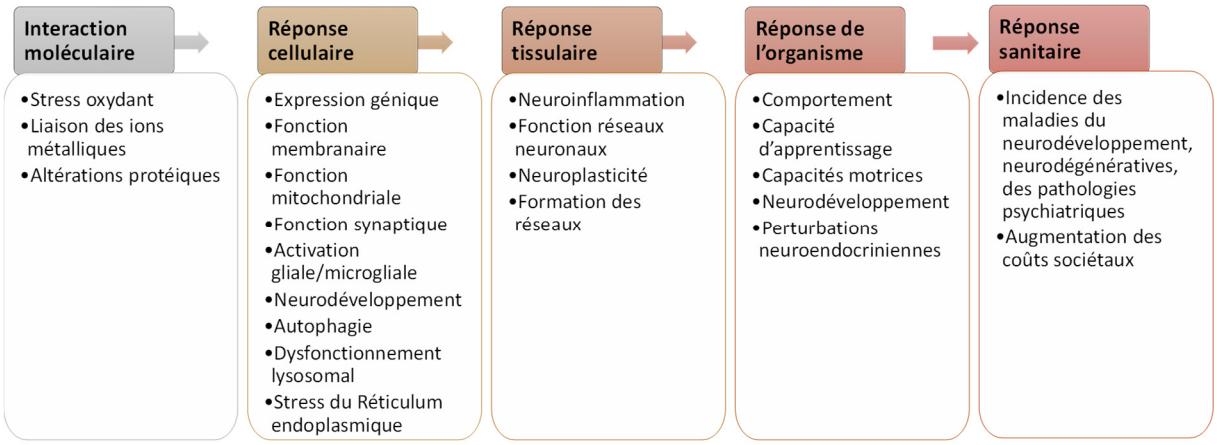


Figure 16. Exemples d'évènements clés menant aux effets neurotoxiques des NM, adapté de (Boyes and van Thriel, 2020). L'événement d'initiation est généralement d'origine moléculaire provoquant le déroulement des autres évènements associés à l'effet du toxique, par l'intermédiaire d'altérations cellulaires, tissulaires, puis de l'organisme, qui sont finalement objectivables au niveau épidémiologique. Des exemples spécifiques d'effets des NM peuvent être identifiés à chaque étape, mais il n'y a actuellement pas assez de données qualitatives et quantitatives pour prédire la relation dose-réponse entre les différents évènements et entre les différentes espèces (Ankley et al., 2010).

L'un des principaux mécanismes de toxicité des NM inorganiques, est leur possible dissolution dans les fluides biologiques, libérant ainsi des ions métalliques particulièrement toxiques. Ceci est pertinent pour les matériaux qui peuvent être relativement solubles (Ag, Cu, Zn etc.) mais peu probable pour des matériaux comme le $nTiO_2$ (Soto-Alvaredo et al., 2014).

Par ailleurs, sur des cultures primaires de cellules du cervelet, l'exposition aux nanoparticules d'argent provoque une excitotoxicité (hyperactivation pathologique neuronale) entraînant un déséquilibre calcique intracellulaire, une altération de la fonction mitochondriale, et un déséquilibre de la production d'ERO, aboutissant à une destruction neuronale (Ziemińska et al., 2014). De plus, au sein de neurones corticaux primaires cultivés sur microélectrodes, le noir de carbone, l'oxyde de fer, les nanoparticules de CeO_2 et le $nTiO_2$ ont montré pouvoir modifier l'activité électrique des réseaux neuronaux, avec une amplitude qui était opposée au pouvoir oxydant des NM utilisés (Gramowski A. et al., 2010). Dans ces études, la génération d'ERO était la conséquence de l'excitotoxicité plutôt que l'événement initiateur des altérations toxiques, montrant que la simple mesure du potentiel oxydant ne peut suffire à décrire la complexité des évènements neurotoxiques. Ainsi, les effets des NM sur l'activité du réseau neuronal ne sont pas nécessairement liés à la génération d'ERO, malgré leur rôle théorique de premier plan dans les mécanismes moléculaires de la neurotoxicité des NM.

En cas d'altérations du SNC, il y a une augmentation de l'expression des voies pro-inflammatoires cellulaires conduisant à l'activation de la microglie, pouvant renforcer indirectement la neurotoxicité des

NM. Chez la souris par exemple, l'exposition de cultures primaires de striatum au $nTiO_2$ provoque la libération de marqueurs pro-inflammatoires et la formation d'ERO en raison de l'activation microgliale, ce qui conduit à une apoptose neuronale. Cette mort neuronale est plus forte dans les cocultures de neurones associés à des cellules microgliales que dans les cultures de neurones seuls (Long Thomas C. et al., 2007). Ceci montre le besoin d'utiliser des modèles reproduisant au mieux le SNC dans toute sa complexité. Ainsi, les modèles *in vivo* paraissent indispensables en comparaison des modèles *in vitro*, car étant plus réalistes dans leur capacité à rendre compte des interactions cellulaires cérébrales.

3.5. Le paraquat : un herbicide suspecté de provoquer la maladie de Parkinson

3.5.1. Présentation de la maladie de Parkinson

La MP est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle fait partie des α-synucléinopathies, groupe de maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation pathologique d'agrégats d'α-synucléine. Elle touche mondialement environ 1% des plus de 65 ans mais son étiologie reste encore incomprise (Carboni and Lingor, 2015). Les cas de MP peuvent être divisés en cas familiaux ou idiopathiques. Même s'ils restent méconnus, il existe des facteurs de risque associés au développement de la maladie, ils peuvent être d'origine environnementale (exposition aux polluants, modes de vie etc.) ou bien génétiques, ce qui concerne 5 à 10% des patients (Bellou et al., 2016). Les formes génétiques représentent des mutations identifiées pour des gènes spécifiques, tels que *Snca* ou *Parkin*. Le gène *Snca* a été le premier gène lié à des mutations menant à une forme autosomale dominante identifiée dans des cas familiaux de la MP. Les patients présentant des mutations de ce gène ont un âge d'apparition de la maladie précoce, ainsi qu'une progression pathologique menant plus rapidement au déclin cognitif et à la démence.

Un excès de risque est observé dans les populations exposées aux pesticides, c'est pourquoi l'état français a inscrit en 2012 « la maladie de Parkinson provoquée par les pesticides » au tableau des maladies professionnelles agricoles[10]. Il existe en effet un excès de risque de 67% attribuable à l'exposition professionnelle aux pesticides (Gunnarsson and Bodin, 2017), qui est clairement identifiable pour certaines classes spécifiques de produits connus pour provoquer un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydant comme le PQ (Kamel et al., 2007).

[10] https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000025804441

3.5.1.1. Pathogenèse

Les symptômes de la MP résultent de la mort progressive des neurones dopaminergiques d'une structure mésencéphalique impliquée dans la régulation des noyaux gris centraux, la SN *pars compacta* (SNpc) (Figure 17). Cette aire cérébrale joue un rôle central, spécifiquement dans le contrôle des mouvements volontaires. Les mécanismes d'action toxique décrits pour favoriser le développement de la MP sont : l'induction d'un stress oxydant, une perturbation des fonctions mitochondriales, la perturbation de l'homéostasie calcique et une potentialisation de l'agrégation protéique (Thany et al., 2013). Il est largement reconnu que les mitochondries jouent un rôle central dans la physiopathologie de la MP, par leur production intrinsèque d'ERO et par la déplétion énergétique progressive en ATP (adénosine triphosphate) qui survient au cours du vieillissement (Luo et al., 2015). Il est aussi suspecté que les neurones dopaminergiques soient plus sensibles au stress oxydant à cause du métabolisme important de la dopamine, générateur d'une production intrinsèque d'ERO (Foley and Riederer, 2000). D'autre part, la concentration d'enzymes (SOD, GR) et des composés antioxydants (glutathion) y est plus faible qu'ailleurs (Bharath et al., 2002).

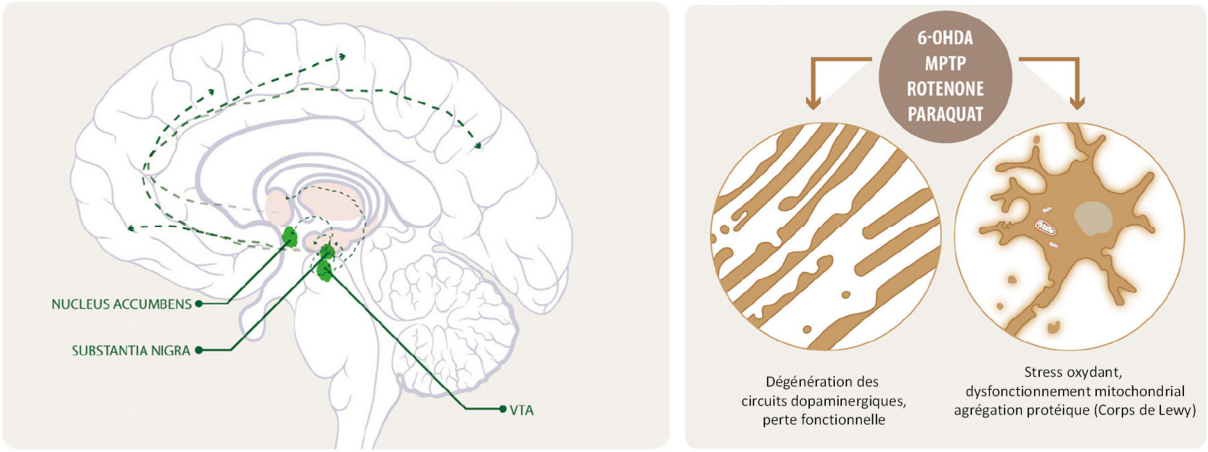


Figure 17. Les voies dopaminergiques et leurs altérations, adapté de (Bastías-Candia et al., 2019). En conditions physiologiques, les messages nerveux en provenance de la SN (*substantia nigria*) sont envoyés vers le striatum, et ceux de l'aire tegmentale ventrale (VTA) vers le noyau accumbens (*nucleus accumbens*) et le cortex frontal. En conditions pathologiques, par exemple à la suite d'une exposition chronique à certains pesticides neurotoxiques pour la SN, le circuit dopaminergique serait altéré, entrainant une perte fonctionnelle et une mort des neurones de la SN. Ces évènement cellulaires entraineraient une diminution de la sécrétion de dopamine et des altérations sur les sites de projections des neurones dopaminergiques. Des accumulations protéiques d'alpha-synucléine se forment à l'intérieur des cellules cérébrales, constituant les corps de Lewy, signe anatomopathologique de la maladie.

Au niveau anatomopathologique, cette perte neuronale est caractérisée par la présence d'inclusions intracellulaires appelées corps de Lewy, composées principalement d'α-synucléine (asyn), sous une

forme protéique pathologique phosphorylée en sérine 129, agrégée sous forme de fibrilles. Ces inclusions représentent le marqueur spécifique dans le diagnostic histopathologique de la MP (Schulz-Schaeffer, 2010). Le déficit de dopamine induit par la perte de ces neurones est responsable des symptômes moteurs, dont les tremblements involontaires sont caractéristiques. Le moment de l'apparition des premiers symptômes moteurs correspond à la perte d'environ 70% des neurones dopaminergiques du système nigrostrié (unissant SN et striatum). La MP est aussi caractérisée par un ensemble de symptômes non moteurs comportant un dysfonctionnement des fonctions comportementales, cognitives et autonomes qui peuvent apparaitre en amont des premiers signes moteurs (Kalia and Lang, 2015). Parmi ces troubles, une hyposmie (perte des facultés olfactives) et une constipation (ralentissement de la motricité intestinale) peuvent être rapprocher de la théorie de la propagation de la maladie dite «théorie de Braak ». En effet, la SN n'est pas la première zone cérébrale présentant des lésions à corps de Lewy car les premières lésions visibles dans le SNC apparaissent dans le bulbe olfactif et dans le tronc cérébral. Braak et ses collaborateurs ont montré une progression rétrograde et centripète de ces lésions, depuis le système nerveux autonome vers les voies dopaminergiques de la SNpc (Braak et al., 2004, 2003, 2002; Kaufmann and Goldstein, 2010). Ainsi, les corps de Lewy apparaissent tout d'abord dans le bulbe olfactif, le noyau moteur dorsal du nerf vague et le système nerveux entérique. Ce schéma de progression des agrégats d'asyn suggère que le système nerveux entérique et les bulbes olfactifs sont impliqués très tôt au cours de la MP provoquant une phase prodromique, c'est-à-dire sans symptôme apparent. Les auteurs énoncent cette hypothèse : « nous proposons qu'un pathogène neurotrope initie les processus pathologiques des cas sporadiques de la MP par une double attaque du système nerveux : de façon antérograde par les bulbes olfactifs et de façon rétrograde par les plexus entériques et les fibres préganglionnaires vagales » (Hawkes et al., 2009). Même si la théorie de Braak n'explique pas la diversité des types de MP, elle pourrait être pertinente pour expliquer l'origine des cas observés chez les agriculteurs exposés chroniquement aux pesticides par inhalation.

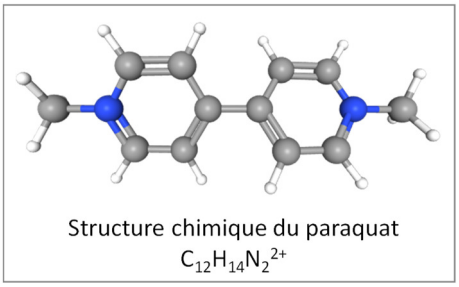
3.5.1.2. L' α-synucléine

L'anomalie de la transmission dopaminergique est centrale dans l'étiologie de la MP, car l'asyn est une protéine transmembranaire essentielle à la libération des neurotransmetteurs assurant la transmission synaptique dans la SNpc (Naughton et al., 2017), elle est également fondamentale dans le fonctionnement des neurones dopaminergiques (Venda et al., 2010). En effet, la tyrosine hydroxylase (TH) est l'enzyme permettant la conversion de la tyrosine en L-DOPA, le précurseur de la dopamine. Cette enzyme essentielle à la régulation des concentrations en dopamine, est trouvée en quantité diminuée chez la majorité des patients parkinsoniens, qui présentent un déficit de la TH au niveau mésencéphalique (Zhu et al., 2012). L'asyn joue un rôle central dans la régulation de la synthèse de

dopamine par son interaction avec la TH (Norris and Giasson, 2005). Plusieurs études ont démontré que l'administration de PQ pouvait induire une pathologie dépendante de l'asyn chez l'animal, notamment visible dans le striatum de souris exposées par injection (Manning-Bog et al., 2002; Wills et al., 2012). Dans un modèle murin muté surexprimant l'asyn humaine, l'injection systémique de PQ induit également une augmentation de l'agrégation de cette protéine (Fernagut et al., 2007).

3.5.2. Le Paraquat

3.5.2.1. Présentation


Structure chimique du paraquat
$C_{12}H_{14}N_2^{2+}$

Le PQ (N, N'-diméthyl-4-4'-bipyridium) est un herbicide empêchant la croissance des adventices par inhibition de la photosynthèse par contact, à la suite de sa pulvérisation et son absorption par les parties aériennes des plantes. Créé en 1961, cet herbicide de synthèse non sélectif possède une action sur tout type d'adventice, en générant un stress oxydant phytotoxique. Il appartient à la famille des bipyridines, et peut être appelé également dichlorure de paraquat, et par ses appellations commerciales les plus courantes, méthyl viologen ou gramoxone® (Syngenta). Pour son faible coût, son large spectre d'action et sa facilité d'usage, son utilisation est recensée dans plus de 90 pays (Fortenberry et al., 2016). C'est un des herbicides les plus usités au monde (Dinis-Oliveira et al., 2008), notamment en remplacement du glyphosate lors du développement d'un phénomène de résistance à sa SA. Il n'est pas limité à un usage strictement agricole, il peut être utilisé pour le traitement des espaces verts, de la voirie, des infrastructures ferroviaires, dans les programmes de reforestation et pour le contrôle de la pousse des algues. Les solutions commerciales prêtes à l'emploi comprennent généralement 30% de PQ dilué en phase aqueuse, sans indications précises au sujet des adjuvants. La présence de certains composés est souvent évoquée : un colorant, un agent d'alerte (odeur répulsive) et d'un émétique pour réduire les risques d'empoisonnement (agent vomitif).

Ayant une pression de vapeur extrêmement faible (Lock and Wilks, 2010) le PQ est non volatil, très hydrophile (log Kow = - 4.22) et soluble (620 g/L), ce qui le rend pratique à manipuler en laboratoire en solution aqueuse, de façon stable et sans risque d'exposition par volatilisation. Dans la littérature, sa demi-vie environnementale varie drastiquement en fonction du type de surface traitée (d'environ 1 mois à 26 ans), mais sa demi-vie la plus couramment rapportée est de 7 ans (Sartori and Vidrio, 2018). Sa demi-vie atmosphérique varie de quelques heures à 64 jours[11]. Sa voie principale de dispersion aérienne

[11]Manuel sur l'Environnement (Volume III): Catalogue des Normes Antipollution (GTZ/BMZ, 1996, 663 pages). Chapitre 5.4.4.Paraquat

serait la dérive durant la pulvérisation, et la sorption sur la matière particulaire du sol, remise en suspension par érosion éolienne (Richard G. Ames Ph.D. et al., 1993). Plusieurs études ont suivi les concentrations massiques en PQ en milieu professionnel durant la pulvérisation selon des méthodologies différentes. Seiber and Woodrow (1981) ont mesuré des concentrations particulaires de 4,31 à 10,7 µg/m³ en bordure d'un champ traité par avion en Californie. Ces concentrations ont rapidement chuté pour atteindre 1 à 10% de leurs valeurs initiales 2 à 4 h après la pulvérisation. Morshed et al., (2010) ont réalisé des mesures en Malaisie au niveau de la zone respiratoire de travailleurs pulvérisant du PQ grâce à des dispositifs hydrauliques dorsaux. La concentration massique moyenne en PQ pouvait atteindre 125 µg/m³, valeur supérieure à la limite maximale d'exposition professionnelle (100 µg/m³), recommandée par le NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health)[12]. La différence entre ces études montre la difficulté d'évaluer globalement l'exposition à un même produit, notamment à cause de l'hétérogénéité importante des modèles agricoles et des conditions climatiques dans chaque pays. En outre, aucune de ces études n'a caractérisé la distribution granulométrique des particules mesurées, paramètre essentiel à l'estimation de la dose reçue par les travailleurs.

En Europe, son utilisation est interdite depuis 2007[13] à cause de sa toxicité aiguë excessive par voie orale. En effet, les intoxications par ingestion d'une solution concentrée de PQ mènent à une fibrose pulmonaire fatale dans la majorité des cas (Berry et al., 2010), car aucun traitement antioxydant ou chélateur évalué ne s'est révélé efficace à ce jour (Gawarammana and Buckley, 2011). Dans 30 à 50% des cas d'intoxication, la mort survient inévitablement après une phase prodromique de 3 à 4 semaines, durant lequel meurent progressivement les cellules pulmonaires, le PQ pouvant causer des atteintes pulmonaires sans inhalation. La dose létale pour un adulte est estimée à quelques grammes seulement (50 mg/kg). Une gorgée prise par inadvertance d'une préparation commerciale à 30% pourrait donc suffire à provoquer le décès d'une personne de 70 kg. C'est le pesticide le plus utilisé dans les tentatives de suicide.

3.5.2.2. Effets toxicologiques

Bien qu'il n'existe pas de valeur réglementaire harmonisée au niveau mondial, la concentration maximale règlementaire autorisée par l'OSHA[12] (Occupational Safety and Health Administration) est de 500 µg/m³ pour la fraction respirable du PQ. Les données toxicologiques présentées dans cette partie (Tableau 7) se réfèrent à des données industrielles non publiées[14,15] et sous couvert de confidentialité, qui ont été soumises aux autorités sanitaires lors de l'homologation du PQ.

[12]https://www.osha.gov/chemicaldata/chemResult.html?RecNo=375
[13]https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000824311
[14]http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v86pr14.htm
[15]https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/20776-paraquat-toxicology-report-supplement-i-toxicology-1-26-10-2016.pdf

Tableau 7. Études réglementaires fournies aux autorités sanitaires par les industriels pour l'évaluation des propriétés toxicologiques du PQ (Reregistration Eligibility Decision Paraquat Dichloride 1997)

	Paramètre	**Concentration**	**Espèce**	**Références**
Toxicité aiguë	DL50 rongeur voie orale	100 - 249 mg/kg	Rat	(Kimbrough and Gaines, 1970) ; (Duerden, 1994c)*
		101 - 203 mg/kg	Souris	(Fletcher, 1967)* ; (Heylings, 1992)*
		22 mg/kg	Cochon d'inde	(Thompson, 1985)*
	DL50 voie cutanée	Pas de mortalité aux doses testées (> 1448 mg/kg)	Rat	(Duerden, 1994c)*
	LC50 voie pulmonaire	500 - 1000 µg/m³	Rat	(Hathway, 1966)* ; (Laird, 1979)* ; (Hardy, 1980)*
Toxicité chronique	DSE voie orale	0,5 mg/kg/jour	Chien	(Sheppard, 1981b)*
	DSE voie pulmonaire	10 µg/m³	Rat	(Laird, 1979)* ; (Hardy, 1980)*

*Études industrielles non publiées. Nomenclature : DL50 : dose létale 50%, concentration causant la mort de la moitié des animaux exposés ; LC50 : concentration létale 50%, concentration massique des aérosols causant la mort de la moitié des animaux exposés ; DSE : dose sans effet toxique, dose maximale pour laquelle aucun signe toxicologique n'a été rapporté.
Ces études confidentielles ont très majoritairement porté sur la voie orale, l'inhalation ayant été jugée comme une voie d'exposition peu probable par les agences réglementaires à l'époque de sa mise sur le marché. La DSE estimée par inhalation est très faible (10 µg/m³, à titre de comparaison, celle du glyphosate est de 1000 µg/m³).

L'exposition orale à une dose faible (1 mg/kg) provoque un passage sanguin mineur car l'absorption intestinale a été estimée à environ 6% chez le rat (Daniel and Gage, 1966a) et le passage cutané a été jugé négligeable (Wester et al., 1984), le PQ n'étant pas liposoluble. L'administration chronique de PQ par voie orale chez le chien (1 an), met en évidence un mécanisme d'action du PQ ciblant les poumons spécifiquement, car un ensemble d'effets pulmonaires sont observés chez ces animaux (hypertrophie de l'épithélium alvéolaire, lésions pulmonaires), pouvant mener à des signes de détresse respiratoire à la dose maximale testée (1,5 mg/kg/j). D'autres études ont analysé sa concentration pulmonaire, démontrant l'existence d'un transport actif du PQ via les transporteurs des polyamines, majoritairement de la circulation sanguine vers les pneumocytes de type II (Hoet et al., 1994).

Le PQ peut traverser la BHE pour atteindre le cerveau (Corasaniti et al., 1998), même si le mécanisme précis est méconnu, il pourrait se faire via les transporteurs de certains acides aminés (Shimizu et al., 2001). Chez la souris exposée à une dose massive par injection intrapéritonéale (10 mg/kg), la

distribution du PQ provoque une forte diffusion dans les organes fortement perfusés (poumons, reins et foie), associée à une élimination cérébrale lente et progressive (demi-vie d'environ 28 jours) (Prasad et al., 2009, 2007). La persistance du PQ dans le SNC contraste avec les autres organes, et elle pourrait contribuer à exercer des effets toxiques prolongés spécifiquement dirigés contre le SNC à l'instar des NM. Bien que d'autres études démontrent également que le PQ possède un potentiel neurotoxique par injection (Litteljohn et al., 2011; McCormack et al., 2005), elles sont difficilement extrapolables à l'homme en raison de l'utilisation de doses élevées et de voies d'exposition ne reflétant par l'exposition des travailleurs agricoles. Néanmoins, à la suite d'inhalations répétées à de faibles doses, il a été récemment rapporté que le PQ était mesuré de façon plus importante dans les bulbes olfactifs que dans les autres aires cérébrales chez le rongeur (Anderson et al., 2020), montrant que cet herbicide pourrait emprunter la voie olfactive pour parvenir au SNC.

Des études ont suggéré que les mélanges de certains composés utilisés de façon routinière par les agriculteurs pourraient potentialiser la toxicité du PQ et donc augmenter le risque de développer une neuropathie. Le mélange de manèbe (fongicide) et de PQ, souvent utilisé par les agriculteurs, a montré pouvoir exercer une synergie toxique sur la SNpc, chez la souris exposée pendant 4 semaines par injection (Thiruchelvam et al., 2000). Par ailleurs, l'exposition combinée au fer (utilisé comme fertilisant), au PQ de cultures de neurones dopaminergiques provoque une neurodégénérescence (Peng et al., 2007). Concernant l'exposition précoce au PQ, certains auteurs ont utilisé un mélange de PQ et de zinc (Mittra et al., 2020), élément utilisé en agriculture et connu pour induire une dégénérescence dopaminergique similaire à celle du PQ (Kumar et al., 2012). Ils ont démontré qu'une exposition précoce au PQ + Zn chez des rats provoquait une atteinte des voies dopaminergiques, et qu'une réexposition des rats adultes provoquait une toxicité exacerbée, par rapport aux rats exposés uniquement à l'âge adulte. Des conclusions similaires ont également été trouvées récemment concernant l'exposition précoce au PQ combiné au manèbe chez la souris (Colle et al., 2020a). Ces résultats soutiennent l'idée qu'une exposition précoce aux pesticides neurotoxiques peut contribuer à la mise en place de maladie neurodégénérative comme la MP, en augmentant la neurotoxicité d'expositions survenant à l'âge adulte.

3.5.2.3. Mécanismes neurotoxiques

Le PQ est capable d'initier un cycle catalytique oxydo-réducteur intracellulaire (Figure 18), qui provoque une déplétion des stocks énergétiques, menant potentiellement à l'apoptose. Il est possible d'atténuer la toxicité du PQ en augmentant l'expression de certaines enzymes antioxydantes, comme la SOD et la glutathion peroxydase (GPx). Néanmoins, le PQ^{2+} peut réaliser ce cycle futile continuellement, générant ainsi des espèces réactives de l'azote et de l'oxygène provoquant un stress oxydant, une baisse progressive des défenses antioxydantes par déplétion des stocks de glutathion réduit (GSH) et de NADPH nécessaires au renouvellement du pool d'antioxydants cellulaires. Ces processus

induisent donc un stress oxydant prolongé et ciblant spécifiquement les tissus sensibles tels que le SNC, et plus particulièrement la SNpc.

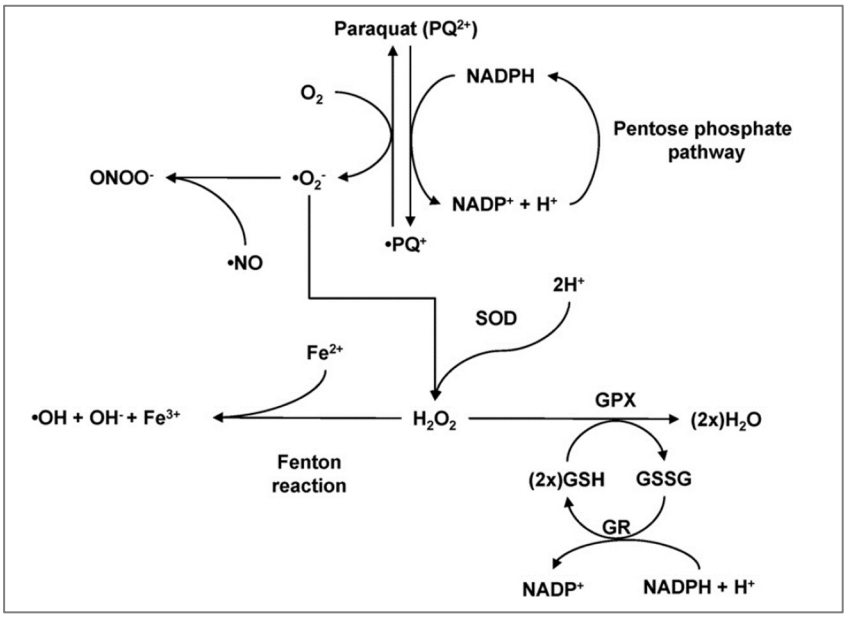


Figure 18. Cycle catalytique du PQ formé en conditions aérobies. Adapté de (Franco et al., 2010). Sa forme dicationique PQ^{2+} peut être réduite en PQ^+ par la NADPH réductase. En présence de dioxygène, ce cation va être réoxydé tout en produisant un anion superoxyde ($^{\bullet}O_2^-$), qui sera pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce qui peut également provoquer la formation de espèces réactifs de l'azote ($ONOO^{\bullet}$). L'H_2O_2 formé est métabolisé par la glutathion péroxydase (GPx) en utilisant le stock de glutathion réduit (GSH). La forme oxydée du glutathion (GSSG) sera ensuite réduite grâce au NADPH.

Certains auteurs ont suggéré que cette neurotoxicité pouvait cibler spécifiquement les neurones dopaminergiques, en agissant de la même façon qu'un autre toxique bien connu, le MPTP (1-methyl-4-phenylpyridinium), dont la structure chimique est très proche du PQ (Miller, 2007; Richardson et al., 2005). En effet, l'injection de PQ chez la souris a montré pouvoir réduire le nombre de neurones exprimant la tyrosine hydroxylase (le marqueur principal des neurones dopaminergiques) de la SNpc (Jiao et al., 2012; McCormack et al., 2002). Également, certains auteurs ont mis en évidence une altération du renouvellement de la dopamine (Shepherd et al., 2006; Songin et al., 2011) et ses métabolites (DOPAC et l'acide homovanillique) (Kang et al., 2009) dans le striatum des souris. Malgré la connaissance partielle de son mode d'action spécifique sur la SNpc, le PQ est reconnu comme un substance pouvant induire une neurodégénérescence chez l'animal, et utilisé comme modèle d'étude de la MP (Cory-Slechta Deborah A. et al., 2005), notamment pour étudier les mécanismes d'initiation de la pathologie. Le modèle d'étude *in vivo* le plus utilisé dans la littérature scientifique pour décrire

l'incidence du PQ sur les neurones dopaminergique est la souche murine C57Bl/6J traitée par injection ou par voie orale (McCormack et al., 2002).

Son mécanisme d'action toxique sur le cerveau (Figure 19) peut induire une mort neuronale en fonction de la durée et des concentrations d'exposition mises en jeu (McCormack et al., 2006; Prediger et al., 2012). Si le mécanisme par lequel le PQ est internalisé dans les neurones est controversé, il est cependant avéré qu'il peut induire une génération cytoplasmique d'ERO par trois voies majoritaires : son cycle oxydo-réducteur, l'inhibition le chaîne de transport électronique mitochondriale, et l'induction/activation de l'expression de la NADPH oxydase, dont la fonction est de catalyser la production intrinsèque d'ERO dans les cellules phagocytaires (Chuong Nguyen et al., 2015), comme les cellules microgliales. En dehors du stress oxydant induit, le PQ a également montré pouvoir activer les cellules gliales, dont l'action oxydante provoquera un contexte neuroinflammatoire renforçant sa toxicité.

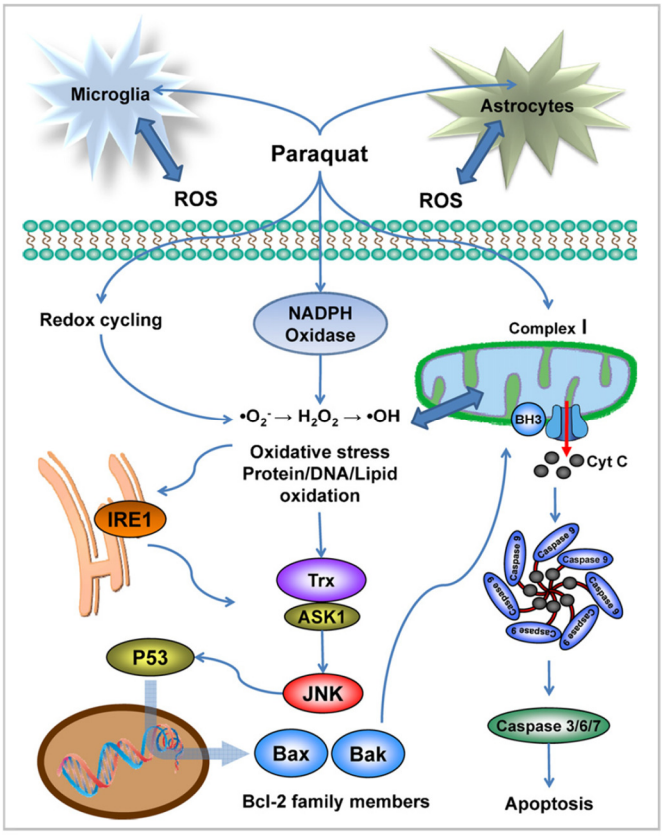


Figure 19. Mécanismes d'action du PQ sur le SNC. Adapté de (Franco et al., 2010). Les altérations cellulaires résultant de l'accumulation des ERO, provoquent l'activation de la signalisation de la mort cellulaire. La perte neuronale serait majoritairement due à l'apoptose induite. Le stress oxydant pourrait activer l'apoptose par voie mitochondriale, et il a également été suggéré que le PQ peut potentialiser cette mort cellulaire par d'autres voies : la voie de signalisation ASK1/JNK par l'induction du stress du réticulum endoplasmique et l'activation de IRE1, et également l'oxydation de la thiorédoxine. L'ensemble de ces évènements mènent *in fine* à la libération du cytochrome C mitochondrial, à l'activation des caspases, menant à l'activation en cascade des protéases effectrices de l'apoptose.

4. Notion de mélange et effets cocktails

4.1. Modulation des effets toxiques

L'effet cocktail est une notion employée pour désigner les effets d'une exposition à plusieurs substances chimiques simultanément, pouvant avoir un effet biologique additif, synergique, voire antagoniste. Dans un NPe, les nouvelles propriétés conférées par la présence de NM, peuvent entraîner une transformation de la toxicité du mélange, qui n'est pas clairement pris en compte dans la réglementation actuelle (Kookana et al., 2014). Une formulation « nano » est susceptible de modifier la biodistribution et la réactivité des composants d'un produit, spécialement s'il comporte des NM ayant la capacité de passer les barrières biologiques telles que le placenta (Bongaerts et al., 2020), 2020) et la BHE (Sharma et al., 2020), ce qui pourrait potentialiser la toxicité des SA sous forme d'effets additifs ou synergiques (multiplicatifs). L'amélioration de la biodisponibilité des composés recherchée par l'usage des polymères, des nanocapsules et de certaines nanoparticules, peut amener les SA à pénétrer plus facilement les organismes non-cibles. Cet effet « cheval de Troie », déjà décrit dans l'exposition aux NM (Kühnel et al., 2018), peut augmenter le passage des barrières biologiques, tout en permettant le passage d'autres xénobiotiques étant associés à la corona entourant les NM. Par exemple, le $nTiO_2$ peut interagir avec les métaux lourds bioaccumulables présents naturellement dans les sols, tels que le plomb, l'arsenic, le cuivre, et le cadmium, et donc potentiellement agir comme vecteur de ces substances. Par ailleurs, la combinaison de $nTiO_2$ avec certains plastifiants (Bisphénol A), pesticides (p,p-DDT), ou bien son interaction avec des facteurs physiques (UV-A), a déjà montré pouvoir augmenter son potentiel oxydant et sa toxicité (Liu et al., 2013). La combinaison mise en jeu dans un NPe peut donc provoquer des phénomènes toxiques encore méconnus. Par ailleurs, le $nTiO_2$ peut également provoquer une inflammation et une perturbation d'un modèle *in vitro* de BHE (Brun et al., 2012), ce qui pourrait potentialiser la neurotoxicité d'autres facteurs de stress en cas d'exposition impliquant un mélange de substances neurotoxiques.

4.2. Effets cocktails décrits entre NM et xénobiotiques

Naasz et al. (2018) ont passé en revue 151 études écotoxicologiques (*in vitro* et *in vivo*) ayant trait à une coexposition à NM et à un xénobiotique (métaux, perturbateurs endocriniens, polluants…). Pratiquement la moitié des études utilisaient comme NM le $nTiO_2$, suivi des nanotubes de carbones et des fullerènes. Ils ont rapporté une augmentation de la toxicité imputable à la présence des NM dans 127 études, une diminution dans 26, et 18 n'ont montré aucune modulation des effets toxiques. Concernant les études montrant une toxicité exacerbée par la coexposition, elles ont concerné indistinctement les différentes combinaisons possibles de famille chimique (NM organique/inorganique

avec chimique organique/inorganique). Par ailleurs, la toxicité était imputable aux chimiques plutôt qu'aux NM, car le plus souvent le NM seul n'induisait pas de toxicité aiguë en soi. Les études décrites attribuent cet effet cocktail à une biodisponibilité supérieure du chimique en présence du NM. Certaines études ont postulé l'existence d'une activité catalytique du NM menant à la formation de métabolites toxiques. À l'inverse, certains auteurs ayant observé une baisse de l'effet toxique du mélange, l'expliquent par une diminution de la biodisponibilité du chimique, dont l'hypothèse mécanistique serait sa sorption sur le NM, empêchant ainsi la biodistribution du xénobiotique.

Les mécanismes décrits dans ces études sont présentés dans la Figure 20 et le Tableau 8. Trois scénarios d'exposition ont été décrits. L'exposition à un xénobiotique exclusivement associé au NM (1), l'exposition à un xénobiotique seul et partiellement associé au NM (2) , l'exposition à un xénobiotique seul et au NM seul (3) . Le scénario (2) semble être la situation la plus récurrente dans les études, mais l'estimation de la fraction liée par rapport à celle libre est rarement disponible. L'absorption du xénobiotique peut être augmentée lorsqu'il est adsorbé sur un NM qui peut être internalisé. À l'inverse, une diminution de l'absorption peut avoir lieu si le NM n'est pas, ou peu internalisé. La désorption du xénobiotique constitue un paramètre important. Si elle se produit après l'internalisation, ceci mène à une augmentation de la dose reçue du xénobiotique (Cheval de Troie [+]). Si elle ne peut pas se produire, la dose reçue xénobiotique ne sera pas affectée, ou bien elle sera même diminuée par la présence du NM (Cheval de Troie [-]). Si le NM n'a pas été internalisé, il peut tout de même y être associé, par exemple sur la peau ou dans son environnement immédiat (eau, nourriture, air…). Il peut jouer localement un rôle sur l'intégrité de la barrière biologique mise en jeu (cutanée, alvéolaire, intestinale), avoir des conséquences sur l'absorption du xénobiotique (rétention), et/ou servir de transporteur si le xénobiotique peut se désorber.

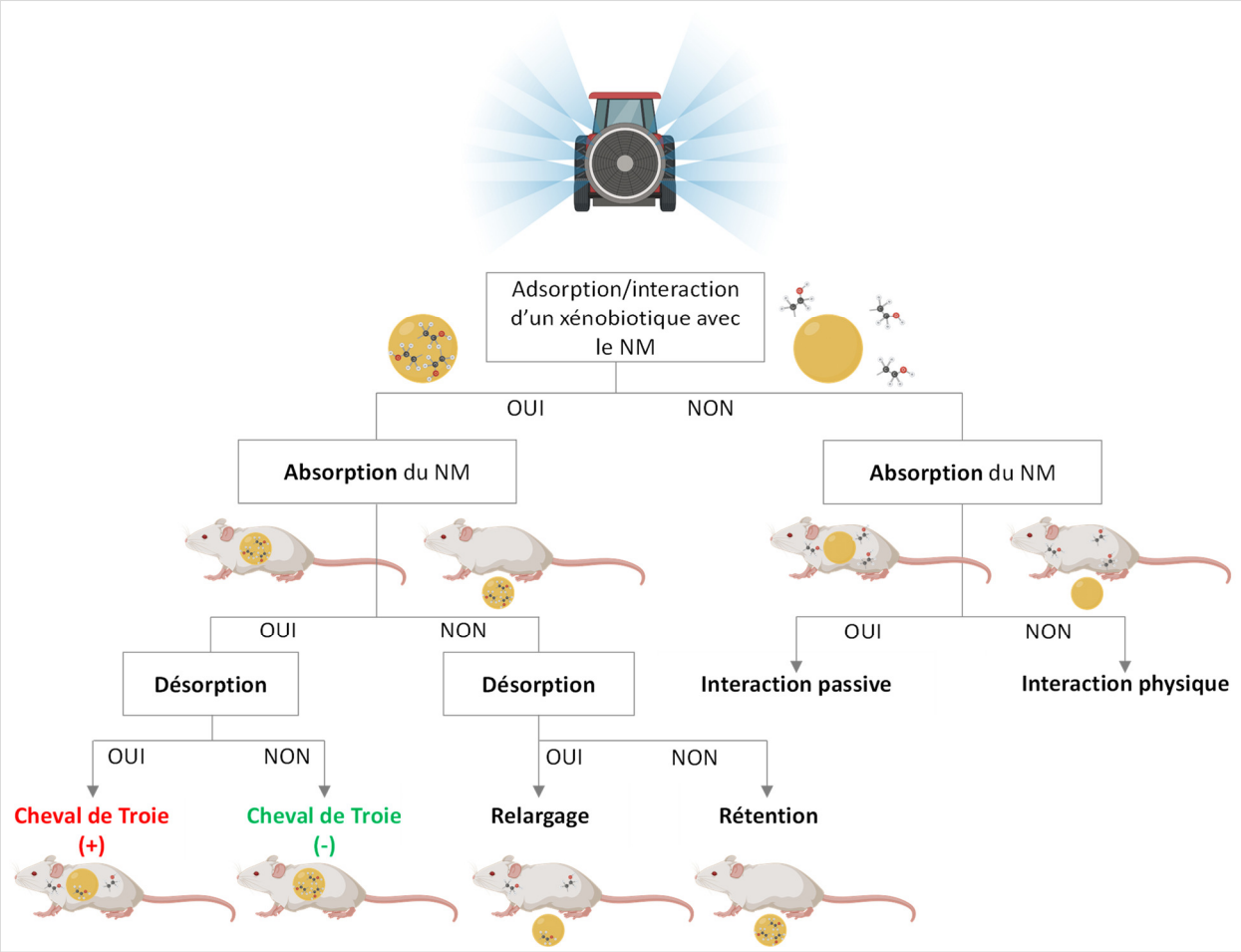


Figure 20. Illustration des effets cocktails possibles entre NM et xénobiotiques, adapté de (Naasz et al., 2018). Illustration créée avec BioRender.com
Cheval de Troie (+) : absorption d'un xénobiotique augmentée par le NM, toxicité exacerbée.
Cheval de Troie (-) : absorption d'un xénobiotique augmentée par le NM et piégeage (désorption impossible), biodisponibilité et toxicité diminuée.
Relargage : modification de la toxicité d'un xénobiotique, si le NM induit son relargage dans l'environnement immédiat de l'organisme.
Rétention : modification de la biodisponibilité et de la toxicité du xénobiotique par le NM.
Interaction passive : Modulation de la toxicité, par effet indirect du NM (induction des enzymes de détoxification, inhibition/activation du transport du xénobiotique…).
Interaction physique : Modulation du transport/absorption du xénobiotique, par effet physique du NM sur l'intégrité des barrières biologiques de l'organisme exposé.

Phénomène	NM	Références	Effet
Cheval de Troie (+)	TiO_2	(Rosenfeldt et al., 2014)	+
		(Fan et al., 2011)	+
		(Fang et al., 2015)	+
		(Ma et al., 2017)	+
		(Tan and Wang, 2014)	+
		(Q. Wang et al., 2014)	+
	CNT	(Qu et al., 2014)	+
		(C. Wang et al., 2014)	+
		(Wang et al., 2016)	+
	CeO_2	(Han et al., 2012)	+
	Fe_2O_3/Al_3O_2	(Hu et al., 2012)	+
	Graphène	(Della Torre et al., 2015)	+
	Fullerènes	(Tao et al., 2013)	+
Cheval de Troie (-)	TiO_2	(Dalai et al., 2014)	-
		(Rosenfeldt et al., 2014)	-
		(Rosenfeldt et al., 2015)	-
		(Tan et al., 2017)	-
		(C. Yan et al., 2017)	-
		(W.-W. Yang et al., 2012a)	-
	Charbon actif	(Fang et al., 2011)	-
Relargage	TiO_2	(Zhu et al., 2011)	+/-
Rétention	TiO_2	(Li et al., 2016)	+/-
		(W.-W. Yang et al., 2012b)	-
	CNT	(Lee et al., 2016)	+/-
Interaction passive	TiO_2	(Balbi et al., 2014)	+/-
		(Liu and Wang, 2015)	+/-
Interaction physique	Al_3O_2	(Dalai et al., 2014)	+/-

«+» : toxicité exacerbée par le NM
«-» : toxicité atténuée par le NM

Tableau 8. Articles écotoxicologiques issus de la littérature mettant en lumière des effets cocktails potentiels entre NM et xénobiotiques. Parmi les études associées au $nTiO_2$, 6 ont montré une toxicité exacerbée, 7 une toxicité décrue, 4 n'ont montré aucun effet du mélange. Les phénomènes en jeu semblent pointer vers des effets type « cheval de Troie » par adsorption des composés à la surface de ces nanoparticules, soit les séquestrant, soit en provoquant leur transport facilité vers les organes cibles.

III. Les modèles d'étude toxicologique par inhalation

Compte tenu du fait que les données toxicologiques ont été obtenues par le passé avec des produits chimiques conventionnels, les valeurs toxicologiques réglementaires ne semblent pas adaptées aux formes nanométriques émergentes (Boyes and van Thriel, 2020). Les études nanotoxicologiques doivent en effet tenir compte non seulement de la composition chimique mais également des caractéristiques physico-chimiques propres aux NM (Bencsik and Lestaevel, 2021). Ainsi, de nouvelles méthodes d'analyse et de nouvelles données d'évaluation du risque sont nécessaires pour procéder à l'évaluation du risque sanitaire associé aux NM en mélange avec les pesticides.

Les tests harmonisés réglementaires proposés par l'OCDE, incorporent des protocoles d'évaluation de la toxicité neurodéveloppementale qui figurent parmi les plus exigeants (OECD TG 426: Developmental Neurotoxicity Study), fondés sur l'administration de plusieurs doses d'une substance à un nombre important d'animaux (au moins 20 gestantes/dose). Bien que ces tests soient des normes reconnues internationalement, il existe désormais de nouvelles priorités, décrites par la directive européenne 2010/63/EU ayant pour objectif de réduire l'utilisation des animaux en expérimentation *in vivo* (Richmond, 2000). Cette prise en compte du principe des « 3R » (remplacer, réduire et raffiner) nécessite d'évaluer les nouvelles substances en privilégiant des approches *in vitro* et *in silico* pour identifier spécifiquement les composés jugés les plus préoccupants.

Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, en tant qu'organe le plus complexe, le SNC est l'objet de craintes sanitaires majeures concernant l'inhalation des NM. La fonction cérébrale dépend d'interactions extrêmement complexes dont la compréhension n'est pas permise par l'analyse de ses composants de façon isolée (par exemple par des systèmes *in vitro* simples). Les tests de neurotoxicité ne peuvent donc pas se soustraire à l'utilisation de modèles *in vivo*, notamment dans le cadre des études neurodéveloppementales. Pour ces raisons, il est nécessaire de mettre en place une stratégie intégrative impliquant plusieurs domaines de recherche complémentaires. C'est pourquoi sont présentés dans cette partie les éléments clés en matière de métrologie des aérosols à prendre en compte pour étudier les effets de l'inhalation d'un modèle de NPe, qui soit en phase avec les exigences associées aux protocoles d'exposition aux aérosols utilisés en nanotoxicologie.

1. Les dispositifs d'exposition aux aérosols de NM

1.1. Méthodes d'exposition *in vivo*

Pour mettre en place des modèles expérimentaux d'étude par inhalation, il existe plusieurs types de protocoles toxicologiques qui suivent les lignes directrices de l'OCDE :

- L'exposition aiguë analyse les effets au court terme par une exposition unique et massive (OECD TG 403: Acute Inhalation Toxicity)
- L'exposition subaiguë correspond à une exposition répétée sur une période inférieure à un mois (OECD TG 412: Subacute Inhalation Toxicity)
- L'exposition subchronique est une exposition répétée, durant 1 à 3 mois (OECD TG 413: Subchronic Inhalation Toxicity)
- L'exposition chronique est une exposition durant plus de 3 mois, pouvant aller jusqu'aux deux tiers de la durée de vie du modèle utilisé (OECD TG 452: Chronic Toxicity Studies)

Le choix du mode d'exposition des animaux est un paramètre primordial. À ce titre, deux grandes catégories de modèles d'étude existent, dits invasifs ou non (Fröhlich and Salar-Behzadi, 2014), dont les différentes spécificités ont été largement étudiées dans la littérature (Dorato and Wolff, 1991; Lucci et al., 2020; MacFarland, 1983; Magos, 1989; Phalen, 2009). Ces méthodes sont représentées en Figure 21.

Les techniques invasives consistent à administrer directement dans les voies aériennes des animaux une suspension dans laquelle sont dispersés les NM d'intérêt. Cette exposition peut se faire par instillation ou par aspiration. Ces méthodes correspondent à une injection dans la fosse nasale ou dans la trachée des animaux, généralement grâce à la mise en place d'un cathéter. Ces méthodes ont l'avantage de délivrer des doses facilement contrôlées et homogènes, sans nécessiter de système d'exposition complexe, ce qui les rend faciles à mettre en œuvre. Elles sont ainsi souvent utilisées pour l'étude de la toxicité aigüe ou subaigüe des NM. En revanche, elles nécessitent une anesthésie préalable des animaux et elle ne se prêtent pas aux études sur le long terme. En outre, elles sont peu représentatives d'une exposition chronique par inhalation chez l'être humain, dans le cadre d'un scénario d'exposition environnementale ou professionnelle. Par ailleurs, elles ne permettent pas d'étudier les paramètres de dépôt dans les voies aériennes associés aux paramètres physico-chimiques des aérosols, éléments déterminants des effets toxicologiques. À l'inverse, l'inhalation corps entier (« whole-body ») ou nez seul (« nose-only ») sont des méthodes non-invasives, elles reflètent de façon réaliste une inhalation chez l'animal et elles peuvent permettre une exposition au long-terme pour étudier la toxicité chronique.

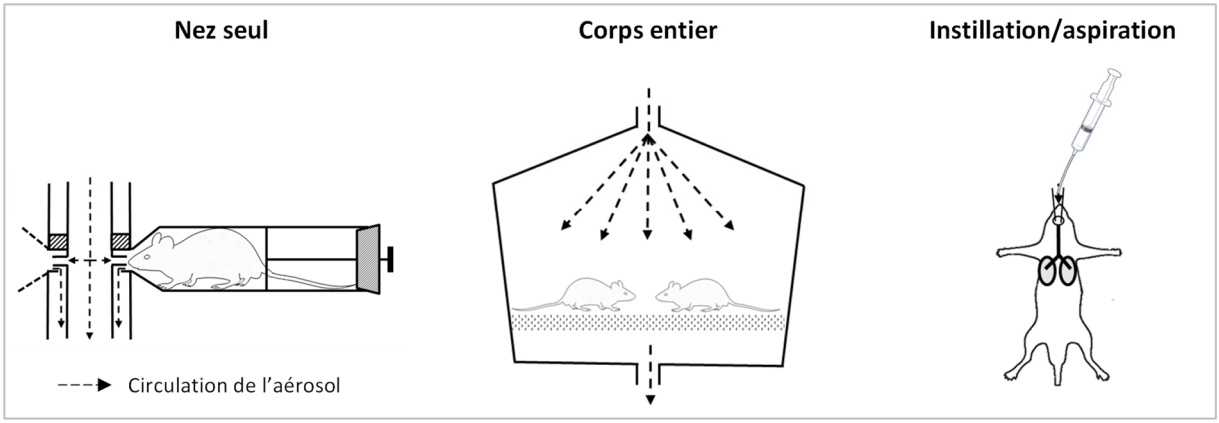


Figure 21. Représentation des dispositifs d'exposition *in vivo* par voie pulmonaire (illustration adaptée du travail doctoral de L. Chézeaux). D'autres modèles existent également, comme l'intubation trachéale sur animal anesthésié.

1.1.1. Instillation/aspiration

Ce sont des méthodes permettant de maîtriser précisément la dose injectée dans les voies respiratoires, tout en évitant la complexité du contrôle de la dose reçue associée aux dispositifs d'inhalation. Elles nécessitent une manipulation intensive des animaux (anesthésie ou exigences de contention) n'autorisant en général qu'un traitement sur le court terme. Par ailleurs, il est reconnu que l'administration des NM via ces méthodes provoque une distribution hétérogène dans les voies aériennes (Driscoll et al., 2000). Par exemple, il a été observé que des rats exposés par instillation intratrachéale et par inhalation à une dose équivalente de $nTiO_2$, ne présentaient pas la même réponse toxicologique (Baisch et al., 2014; Okada et al., 2019; Osier and Oberdörster, 1997). Ceux exposés par injection intratrachéale ont montré une rétention et une réponse pulmonaire plus importante, indiquant que ce mode d'exposition modifie considérablement les propriétés des particules utilisées en termes de dose et de distribution pulmonaire. Les auteurs ont suggéré que cette différence pouvait s'expliquer par une formation d'agglomérats particulaires à proximité du lieu de l'instillation, provoquant une distribution moins homogène que celle obtenue par l'inhalation, causant ainsi une réponse inflammatoire exacerbée en certains endroits. Le fait que les particules soient mal dispersées, peut également minimiser le passage sanguin qui a lieu pour les plus petites particules. En outre, ces méthodes ne permettent pas de prendre en compte l'intégralité des voies d'absorption des particules (via l'épithélium olfactif, passage oculaire, passage cutanée), elles ne sont donc pas les plus pertinentes pour mener des études neurotoxiques et neurodéveloppementales.

1.1.2. Inhalation

Afin de prendre en compte la complexité des caractéristiques des aérosols, et les différentes voies d'absorption possibles, les dispositifs d'inhalation sont les plus appropriés pour réaliser une étude au moyen ou au long terme. Mais elles sont plus coûteuses et difficiles à mettre en œuvre, car elles nécessitent la génération d'aérosols stables temporellement et spatialement à l'intérieur de l'enceinte d'exposition, pour exposer tous les animaux d'une façon homogène et contrôlée. L'inhalation corps entier ou « nez seul » (restreinte au nez), sont des méthodes donnant des résultats similaires sur l'exposition pulmonaire aux nanoparticules, comme en témoignent les résultats obtenus par Oyabu et al. (2016) sur des rats exposés par ces deux voies au $nTiO_2$. Le contenu élémentaire pulmonaire de titane a été mesuré par spectrométrie de masse (ICP-MS) dans chacun des groupes, montrant une cohérence entre les deux méthodes.

1.1.2.1. Inhalation « nez seul »

Cette méthode repose sur l'exposition d'animaux immobilisés. Lors de la mise en contention, les animaux sont placés dans des tubes enserrant leur corps en laissant émerger seulement leur museau dans une cellule d'inhalation. Cette technique a des avantages notables, en termes d'homogénéité de la dose administrée à chaque animal et de contrôle du mode d'exposition (inhalation uniquement). Comme décrit précédemment, l'inhalation peut toutefois mener à une exposition secondaire digestive via la relocalisation des particules vers le tractus gastro-intestinal. Ce mode d'exposition nécessite de porter une attention particulière pour que le renouvellement d'air dans chaque tube soit homogène, et permette d'éviter l'accumulation des déchets du métabolisme (CO_2, ammoniac, etc.), un changement de la température dû à la contention, et la recirculation des aérosols exhalés. Néanmoins, le désavantage principal de cette technique repose sur les contraintes imposées aux animaux et à la difficulté de les positionner correctement dans leur tube de contention (Phalen et al., 2014). L'immobilité forcée sur de longues périodes et la manipulation peuvent induire un stress chez l'animal et modifier ses paramètres métaboliques, respiratoires et physiologiques. Ces changements peuvent moduler la réponse aux effets toxiques des aérosols inhalés. Une étude a mis en évidence l'induction d'un stress dû à l'hypothermie chez la souris exposée à la fumée de cigarette, malgré la mise en place d'un dispositif chauffant pour parer à la perte de température corporelle causée par l'immobilité (van Eijl et al., 2006). Par conséquent, l'inhalation « nez seul » permet un meilleur contrôle des doses administrées mais peut générer un stress chez l'animal. L'immobilisation totale des animaux nécessite par ailleurs que la durée des sessions d'exposition n'ait pas d'influence physiologique négative. Ainsi, elle ne peut pas être utilisée pour exposer des animaux pendant une durée trop longue. Par conséquent, elle semble moins adaptée aux expositions chroniques que l'exposition corps entier.

Dans le cadre d'une étude neurodéveloppementale, ce mode d'exposition n'est pas adapté à l'exposition de femelles gestantes. La période prénatale est cruciale pour le neurodéveloppement et la croissance fœtale est dépendante des signaux physiologiques maternels délivrés via le placenta. Chez l'homme, un stress maternel à cette période peut conduire à des problèmes cognitifs, comportementaux et émotionnels observables chez la descendance (King and Laplante, 2005; O'Donnell et al., 2009; Weinstock, 2005). Chez le rongeur, ce stress peut augmenter l'effet tératogène des expositions durant la gestation (Rasco and Hood, 1995). Par exemple, une augmentation de la neurotoxicité développementale dû au stress maternel a notamment été observée chez les souriceaux exposés *in utero* aux particules fines (Bolton Jessica L. et al., 2013). Par conséquent, il est essentiel de minimiser les sources de stress subi par les animaux lors des phases d'exposition qui peuvent constituer un biais expérimental dans l'estimation des conséquences neurodéveloppementales observées, pour s'assurer que les effets toxicologiques sont imputables uniquement aux substances d'intérêt. C'est pourquoi l'exposition lors de la gestation présente un obstacle majeur à l'usage de la contention, à cause du stress potentiel induit chez les animaux gestants et des incidences possibles sur le neurodéveloppement de la progéniture.

1.1.2.2. Corps entier

Cette méthode d'exposition est particulièrement appropriée pour les études chroniques, car les animaux peuvent être exposés en groupe et sans contention. Par ailleurs, les enceintes d'exposition peuvent être compartimentées, afin d'exposer les animaux ensemble, mais dans des enclos individuels. Le nombre d'animaux varie en fonction de la chambre d'exposition mise en place. L'avantage principal de cette méthode réside dans sa capacité à exposer un nombre élevé d'animaux de façon adaptable. Ainsi, plusieurs protocoles peuvent être utilisés en termes d'espèces animales (rats, souris, hamster etc.), de nombre d'individus, de stade de développement (adultes, femelles gestantes, juvéniles), de durée d'exposition, d'ajout d'enrichissement, de nourriture… C'est une méthode d'exposition « naturelle », au sens où les animaux peuvent adopter un comportement social, exploratoire, permettant de minimiser le stress induit par le protocole d'exposition. Les paramètres respiratoires et physiologiques des animaux s'en trouvent d'autant moins affectés. À l'inverse, les désavantages majeurs concernent l'utilisation d'une quantité importante de NM pour générer un aérosol de façon homogène dans l'intégralité de la chambre d'exposition, et le manque de contrôle des voies d'exposition (voies pulmonaire, cutanée, orale, voire oculaire). À ce titre, une fraction de l'aérosol peut être déposée sur le pelage, Griffis et al. (1979) ont montré que 60 - 80% de ce dépôt peut atteindre le tube digestif des animaux. Il a été estimé que la concentration gastro-intestinale mesurée pouvait être deux fois plus importante lors d'expositions corps entier en comparaison de l'exposition « nez seul » (Yeh et al., 1990).

Tableau 9. L'exposition *in vivo* aux aérosols de NM, avantages et inconvénients des différentes méthodes.

Méthode d'exposition		Avantages	Inconvénients
Injection de suspensions	Instillation intratrachéale/nasale	Contrôle de la voie d'exposition Contrôle dose déposée Contrôle lieu de dépôt Faible quantité de NM nécessaire	Invasive Anesthésie requise Lésions tissulaires possibles Peu adaptée aux études chroniques
	Aspiration nasale/oropharyngée		
Inhalation	Intubation trachéale	Contrôle de la voie d'exposition Contrôle dose déposée et des paramètres respiratoires	
	Nez seul	Non-invasive Adaptée aux études chroniques Prise en compte des paramètres physico-chimiques des aérosols Contrôle de la voie d'exposition	Contention des animaux Durée exposition limitée Complexe et coûteuse Variabilité dose déposée
	Corps entier	Non-invasive Adaptée aux études chroniques Prise en compte des paramètres physico-chimiques des aérosols Méthode « naturelle », sans contention Réduction du stress animal Durée étude non contraignante Exposition possible aux stades critiques (gestation, nouveau-nés etc.)	Complexe et coûteuse Variabilité dose déposée Homogénéité atmosphère difficile à contrôler Exposition par voie orale ou cutanée possible

1.2. La production d'aérosol

1.2.1. Les types de générateurs

Un aérosol est défini comme une suspension de particules liquides et/ou solides dans un gaz porteur ayant une vitesse de chute négligeable. Dans des conditions normales de température et de pression, cette vitesse est considérée négligeable pour les particules ayant un diamètre inférieur à 100 µm. Le choix du mode de génération est important pour avoir une méthode fournissant des concentrations en aérosol et une distribution en taille des particules constantes, reproductibles et adaptées au protocole expérimental considéré, qui sont les conditions préalables aux études à long terme. De nombreux types de dispositifs existent pour produire des aérosols de NM, et trois méthodes de génération prédominent (Figure 22) : voie sèche, voie humide, de synthèse directe (Morimoto et al., 2011). Ces trois types de

génération sont présents dans la littérature concernant la génération d'aérosols de $nTiO_2$: génération voie sèche (Noël, 2013), voie humide (Gomez et al., 2013) et de synthèse directe (Jang and Kim, 2001).

La génération par voie sèche se fait généralement à partir de poudre, via un flux d'air et/ou l'application de forces mécaniques. Ces dispositifs permettent de produire des aérosols de nanoparticules à forte concentration mais les forces appliquées sur les particules durant la génération sont insuffisantes pour dissocier les agrégats et les agglomérats. Les aérosols obtenus sont donc en général caractérisés par des distributions granulométriques comprises entre une centaine de nanomètres jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres (Kim et al., 2010; Valverde and Castellanos, 2007). Par ailleurs, il est généralement considéré que la stabilité et la reproductibilité des aérosols générés est plus difficile à maitriser (Schmoll et al., 2009).

La génération par voie humide est réasliée le plus souvent à partir de suspensions aqueuses dans lesquelles sont dispersées les NM d'intérêt, par nébulisation au travers d'une buse suivie d'un séchage des aérosols par l'usage d'un dessiccateur. Les conditions de génération et de séchage des aérosols (concentration et dispersion du NM, solvant, viscosité, taille des buses) déterminent l'état d'agglomération des particules générées. Le dessiccateur est généralement composé de grains de silice poreuse fortement polaire appelée gel de silice, un matériau aux propriétés hygroscopiques (absorption de l'humidité). Ce séchage est nécessaire pour contrôler le taux d'humidité lorsque la production se fait à partir d'une phase aqueuse. Il existe plusieurs types de générateurs tels que les atomiseurs, dit nébuliseurs « à jet », fonctionnant grâce à l'injection d'air pressurisé, l'électro-nébulisation qui utilise un courant électrique, et les nébuliseurs ultrasoniques.

Les méthodes de synthèse directe génèrent des particules à partir de précurseurs sous différents états (liquide, gazeux ou solide). L'exemple montré dans la Figure 22, utilise une phase solide (générateur d'étincelles), où un générateur permet d'appliquer une décharge électrique vaporisant une partie des matériaux des électrodes utilisées.

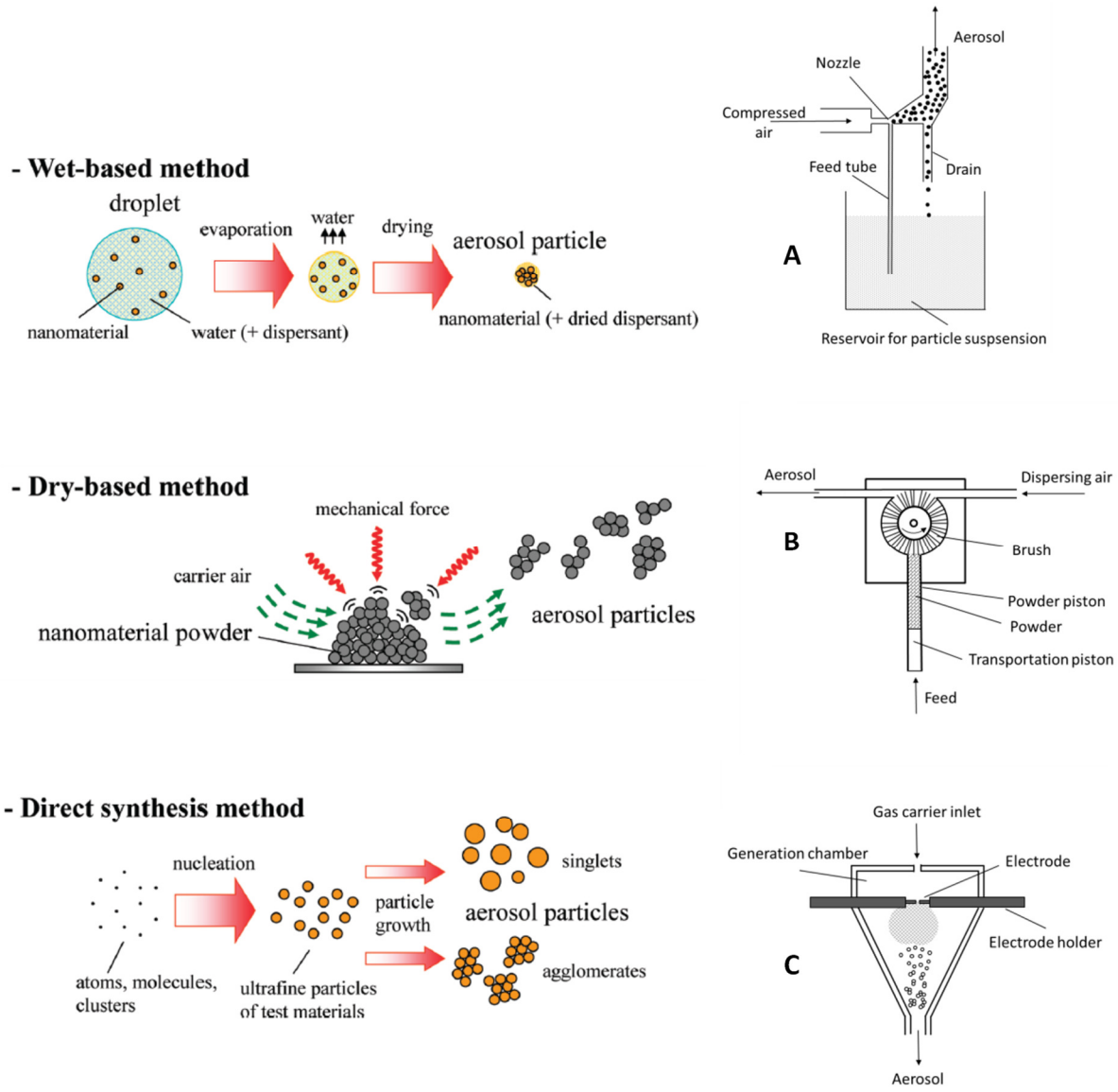


Figure 22. Méthodes principales de génération d'aérosol utilisées dans les dispositifs d'exposition d'après (Morimoto et al., 2011). On distingue les générateurs voie humide (*wet-based method*), voie sèche (*Dry-based method*) et de synthèse directe (*direct synthesis method*). Exemple emblématique de chaque famille: (A) atomiseur, (B) générateur à brosse rotative, (C) générateur d'étincelles.

1.2.2. Efficacité des générateurs

Chaque étude nécessite la méthode de génération d'aérosols appropriée à ses besoins. Différents points sont à considérer pour la sélection d'un générateur adapté :

- La capacité de génération en termes de concentration cible désirée
- L'état d'agglomération des particules générées doit être contrôlé, afin que les aérosols d'intérêt soient cohérents avec le scénario d'exposition défini pour l'étude
- La reproductibilité et la stabilité des aérosols générés en fonction de la durée de l'étude

La génération d'aérosols par voie sèche n'altère pas la composition chimique, tandis que la génération humide peut conduire à des contaminations dues aux impuretés présentes dans la suspension. Mais cette dernière produit des particules ayant une distribution en taille inférieure, car les forces de dispersion mises en jeux lors de la pulvérisation permettent une désagglomération partielle des particules générées. Pour la production de concentrations importantes, les deux premières méthodes sont plus adaptées.

Certains auteurs ont réalisé des études comparatives de l'efficacité des différentes méthodes de génération d'aérosol pour exposer des rongeurs au $nTiO_2$. Pujalté et al. (2017) ont conclu que l'atomiseur était la technique la plus polyvalente pour réaliser une étude toxicologique, au vu de l'étendue de sa capacité de génération (0.5 à 30 mg/m³). Schmoll et al., (2009) ont également conclu que l'atomiseur était la seule technique d'aérosolisation valable combinant à la fois une stabilité et une concentration suffisante dans les conditions de leur étude. Par ailleurs, ils ont démontré que la sonication des nanoparticules en suspension avant leur nébulisation n'avait pas d'effet sur l'état d'agglomération des aérosols de $nTiO_2$ générés (distribution granulométrique moyenne de 151 nm), car l'atomisation permet une désagglomération suffisante des particules. La sonication est usitée de façon routinière en nanotoxicologie au cours des protocoles expérimentaux utilisant des NM en suspension. Pourtant, elle peut induire des modifications, en particulier de l'état d'oxydation et d'hydroxylation des composés de surface (Taurozzi et al., 2011), ce qui peut provoquer des altérations du potentiel oxydant des NM et de la génération d'ERO (Sanhueza et al., 2019). Il est donc probable que les effets des aérosols puissent être affectés par l'usage de la sonication.

2. Développement d'une chambre d'exposition aux aérosols

2.1. Aspects éthiques et réglementaires

Outre l'aspect éthique du respect du bien-être animal, inhérent à tout protocole expérimental, la directive européenne 2010/63/EU relative à la protection des animaux utilisés en recherche, requiert la prise en compte du principe des « 3R » (remplacer, réduire et raffiner l'utilisation des animaux). Il est donc indispensable d'éviter autant que possible toute source de souffrance et de stress, tout en veillant à minimiser le nombre de spécimens requis pour réaliser de façon rigoureuse (reproductibilité, pertinence des données) le protocole mis en place et autorisé par le comité éthique local. Ainsi, les rongeurs de laboratoire doivent posséder un fond génétique connu, être élevés et hébergés dans des conditions standardisées définies par la réglementation relative à l'hébergement des animaux (Protection des animaux dans le Recherche, Articles L214-1 à L214-23). Pour subvenir aux besoins physiologiques des animaux lors de leur élevage, la réglementation impose une température (20 - 24 °C), une humidité relative (40 - 70%) et un renouvellement d'air contrôlé (15 - 25 volumes/heure). Il semble judicieux de proposer un dispositif d'inhalation respectant au mieux ces conditions pour minimiser le stress induit

par les expositions. Pour des raisons de comparaison inter-études, d'éthique et de coût associé aux expérimentations animales, il est prohibitif de concevoir de nouvelles études d'inhalation pour chaque NM, d'où la nécessité de proposer des protocoles harmonisés pouvant être transposables. En accord avec cela, les lignes directrices de l'OCDE mentionnent certaines conditions nécessaires à la réalisation d'études toxicologiques par inhalation (OECD TG 403, 412, 413). Sont ainsi présentés les éléments dans la caractérisation est nécessaire pour assurer une représentativité et une reproductibilité des résultats, tout en étant en accord avec les principes de bien-être animal :

- L'écoulement de l'aérosol dans la chambre d'exposition
- Les paramètres environnementaux auxquels sont soumis les animaux
- La concentration massique en aérosol
- La distribution granulométrique des particules
- La stabilité de l'atmosphère (temporelle et spatiale)

En amont de l'exposition des animaux, une phase de caractérisation de ces paramètres doit donc être réalisée. Comme le diamètre des particules inhalées détermine la quantité et le lieu du dépôt particulaire dans les voies aériennes des animaux, les aérosols générés doivent être contrôlés précisément. À ce titre, il est nécessaire de répondre à certaines exigences en termes de distribution granulométrique des particules afin que celles-ci soient inhalables par les animaux: le diamètre aérodynamique médian en masse (MMAD) doit être inférieur à 2 µm, avec un écart type standard géométrique compris entre 1 et 3. Par ailleurs, les concentrations massiques et en nombre des aérosols étudiés constituent les métriques principales pour quantifier la dose d'exposition des animaux. Au cours des différentes expositions, ces concentrations ne doivent pas dévier de la moyenne globale dans la chambre de plus de 20%, pour un aérosol de particules solides et/ou liquides.

2.2. Caractérisation de l'exposition

2.2.1. Dose d'exposition

La dose d'exposition à un aérosol est une métrique spécifique, qui est liée au dépôt des particules dans les voies aériennes. L'estimation de ce dépôt est donc essentielle pour interpréter les résultats des études par inhalation. La Figure 23 montre la complexité du lien entre concentration d'exposition, et dose reçue par les animaux. Cette dose peut être rapportée de plusieurs manières, en termes de dose inhalée, déposée, ou retenue dans les tissus. Les doses d'exposition nécessitent la prise en compte des caractéristiques des aérosols mais également de la physiologie des animaux. La dose retenue peut être mesurée par une quantification *in situ*, par exemple par spectrométrie de masse, ou elle peut être estimée grâce à la connaissance de la demi-vie des particules dans l'organe considéré.

La dose inhalée repose sur la concentration massique, la durée de l'étude, la concentration en aérosol et la ventilation minute des animaux. La dose déposée est obtenue en multipliant la dose inhalée par la fraction de dépôt, définie comme étant la part de particules déposées dans les tissus par rapport à celle inhalée. Le facteur primordial dans le dépôt des particules inhalées repose sur leur distribution granulométrique. Cette dose déposée peut être utilisée pour permettre l'extrapolation des données obtenues entre espèces, en utilisant la masse corporelle ou la surface pulmonaire comme facteur de pondération.

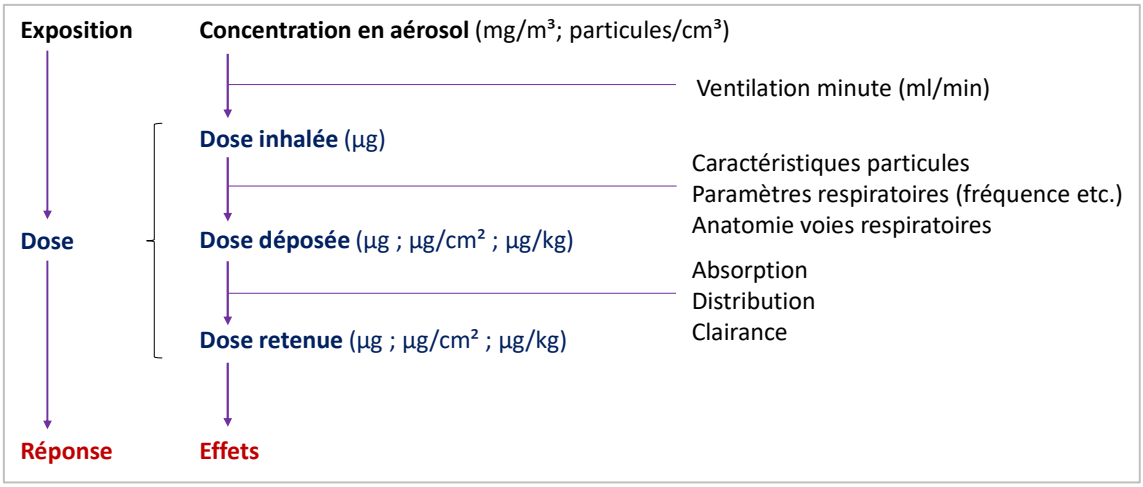


Figure 23. Facteurs principaux impliqués dans la dosimétrie et le dépôt des particules. Adapté de (Oberdörster and Kuhlbusch, 2018). Cette dosimétrie complexe associée au dépôt particulaire dans les voies respiratoires, souligne l'importance de caractériser en amont les aérosols d'intérêt.

2.2.2. Modélisation de la dose déposée

2.2.2.1. Dépôt des particules dans les voies respiratoires

Le comportement des aérosols est le résultat de l'interaction entre ses caractéristiques, les conditions thermodynamiques du fluide porteur (température, pression, hygrométrie, etc.) et des obstacles à l'écoulement qui vont être rencontrés (Darquenne, 2012). Selon leur diamètre, les particules sont soumises à plusieurs phénomènes qui déterminent leur transport et leur dépôt dans les voies aériennes.

Par mouvement brownien, les particules suivent des fluctuations de vitesses et de trajectoires en s'entrechoquant au sein du gaz porteur, ce qui mène à un dépôt et une diffusion dans les tissus. Il a lieu majoritairement dans les alvéoles pulmonaires, où la vitesse d'écoulement des particules décroît le plus. Il concerne les petites particules et devient le mécanisme prédominant aux tailles inférieures à 0,5 µm chez l'homme (Darquenne, 2012) et 0,1 µm chez le rat (Schulz and Muhle, 2000).

L'inertie emmagasinée par une particule lors de son transport peut mener à son dépôt, notamment par impaction (également par turbulence ou centrifugation). L'impaction inertielle est associée aux changements brusques de direction dans l'écoulement des particules. La quantité de mouvement des plus grosses particules tend à les empêcher de suivre le sens de l'écoulement. L'impaction a donc lieu préférentiellement lors des changements de direction, comme les carrefours aériens, ce qui privilégie un dépôt à certains endroits précis (Figure 24).

L'action des champs de forces concerne la sédimentation sous l'effet gravitaire, et la précipitation électrostatique qui intervient sous l'effet des charges électriques. La sédimentation concerne uniquement les particules les plus grosses (1 - 8 µm), les particules les plus petites ayant une vitesse de chute négligeable. Le motif respiratoire lors de l'exposition module ce mécanisme, une apnée augmentera par exemple la rétention des particules dans les voies aériennes distales (Rubin and Fink, 2003). En fonction des moyens de production des aérosols, les mécanismes en jeu peuvent mener à l'obtention de particules chargées électriquement, cette charge particulaire évolue en fonction des collisions avec les ions en présence. Il existe des situations où les particules peuvent être fortement chargées, par exemple en présence d'ions unipolaires, d'un champ électrique, ou d'un rayonnement UV, ce qui peut nécessiter la présence d'un neutraliseur de la charge des particules.

Diamètre aérodynamique des particules (µm)	**Vitesse de sédimentation (µm/s)**	**Coefficient de diffusion moléculaire (mm²/s)**
0,01	$7{,}0 \times 10^{-2}$	$5{,}2 \times 10^{1}$
0.10	$8{,}8 \times 10^{-1}$	$6{,}8 \times 10^{-1}$
1	$3{,}5 \times 10^{1}$	$2{,}8 \times 10^{-2}$
10	$3{,}1 \times 10^{3}$	$2{,}4 \times 10^{-3}$
100	$2{,}5 \times 10^{5}$	-

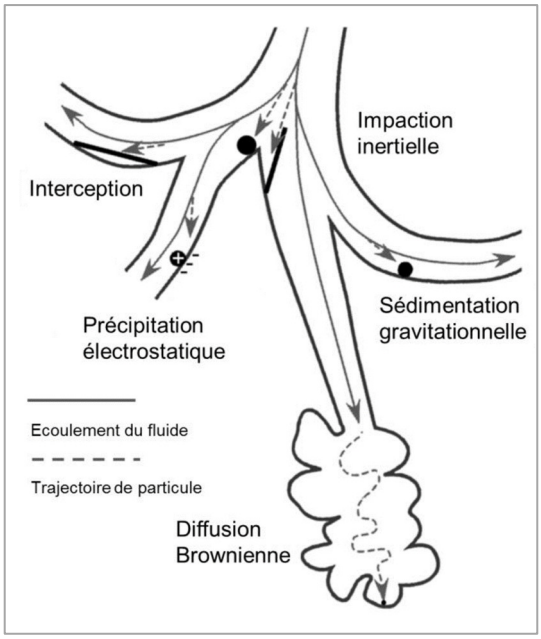


Figure 24. Illustration des mécanismes de dépôt particulaire dans les voies aériennes (Fröhlich and Salar-Behzadi, 2014) et vitesses de sédimentation et de diffusion des particules à 20°C à pression atmosphérique (Laborde, 2006)**.**

2.2.2.2. Le Modèle *Multiple-Path Particle Dosimetry Model* (MPPD)

Le dépôt des particules dans les différentes parties des voies aériennes peut être estimé grâce à l'aide d'outils de modélisation, comme le logiciel *Multiple-Path Particle Dosimetry Model* (MPPD), développé par le *Chemical Industry Institute of Toxicology* et l'Institut néerlandais de santé publique et de l'environnement (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid*). Ce programme permet de modéliser le dépôt particulaire dans l'appareil respiratoire de plusieurs espèces, dont les caractéristiques nécessaires ont été rapportées dans la littérature (morphologies des voies aériennes, paramètres ventilatoires, clairance etc.). MPPD permet l'estimation du dépôt et de la clairance des particules à différents stades de développement, pour des conditions physiologiques spécifiques (poids corporel, ventilation minute, type de respiration nasale/buccale etc.) et pour des scénarios d'exposition personnalisables (durée, fréquence, concentration, etc.). La fraction de dépôt est calculée sur la base des valeurs issues de la caractérisation métrologique des aérosols d'intérêt (distribution granulométrique, concentration, morphologie, etc.) en utilisant les valeurs théoriques de diffusion, de sédimentation, d'impaction et d'interception estimées à partir des paramètres physico-chimiques des particules. Cette fraction correspond au ratio massique des particules déposées par rapport à celles inhalées. Ainsi, la dose d'exposition peut être comparée aux concentrations toxicologiques réglementaires et permettre une extrapolation inter-espèces. Les algorithmes utilisés par ce logiciel, ont été construits en utilisant les bases de données sur la nanotoxicologie des aérosols produites majoritairement sur le rongeur et le lapin, puis comparées aux données obtenues chez l'être humain.

2.2.2.3. Modélisation d'un dépôt de particules modèles

À la suite de leur inhalation, les particules sont soit exhalées, soit déposées dans les différentes parties de l'appareil respiratoire, comprenant les voies aériennes supérieures (fosses nasales, bouche, pharynx et larynx) et inférieures (arbre trachéo-bronchique, alvéoles pulmonaires) (Donaldson et al., 2008). Ainsi, on peut voir chez l'homme et la souris (Figure 25), que les particules de petite taille (approximativement de 10 nm à quelques centaines de nm) se déposent préférentiellement dans les voies aériennes inférieures, tandis que celles plus grossières (>1 µm) se déposent majoritairement dans les voies aériennes supérieures. Bien que l'homme et la souris comportent des différences notables dans leur anatomie respective, ils présentent des profils de fraction de dépôt pulmonaire (en rouge sur la Figure 25) similaires dans la gamme de tailles particulaire comprise entre 10 et 1000 nm, ce qui fait de la souris un bon modèle d'étude en nanotoxicologie, à l'instar du rat.

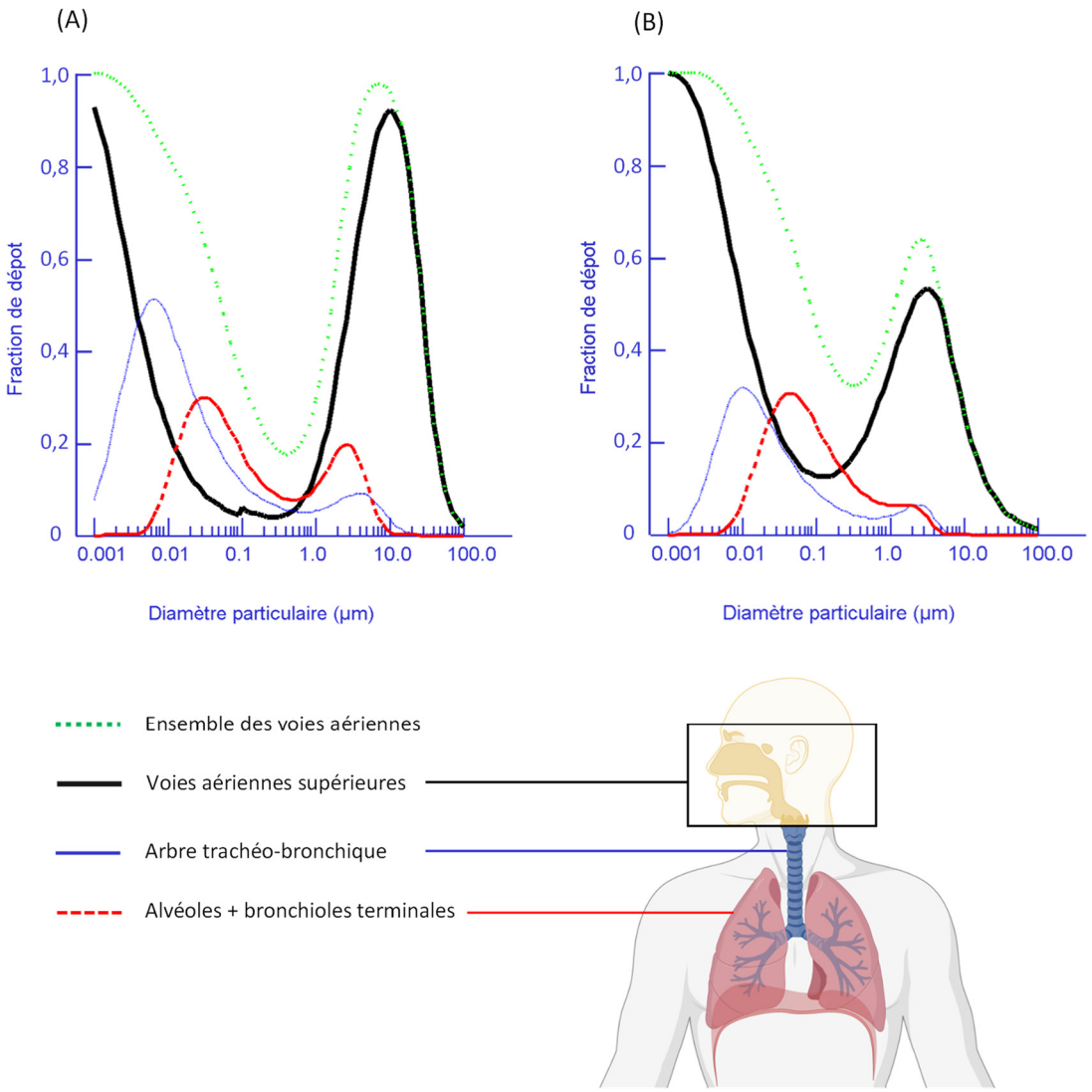


Figure 25. Estimation de la fraction de dépôt particulaire via le modèle MPPD, chez l'être humain (A) et chez la souris (B) pour une exposition à un aérosol polydispersé (1 nm – 100 µm) composé de particules modèles sphériques (masse volumique = 1 g/cm³). Les paramètres physiologiques suivant ont été utilisés, ventilation minute homme au repos : 7,5 L/min par voie nasale (modèle Yeh\Schum Symétrique) ; ventilation souris 22.20 mL/min (modèle BALB/c, 20 g). Il est à noter que ce dépôt est fortement affecté par le type de scénario d'exposition envisagé, en fonction du type de respiration envisagé (orale/nasale, durant un effort etc.) et les caractéristiques des aérosols respirés, qui fera varier l'allure de ces courbes de dépôt.

2.2.3. Dose retenue : mesures *in situ* des concentrations tissulaires

La dose retenue est mesurée directement dans les tissus. À la suite de l'exposition à un aérosol, c'est une donnée importante pour évaluer l'absorption, la distribution et la clairance des composés considérés, afin de décrire les mécanismes toxiques mis en jeu (bioaccumulation, translocation, d'effets directs ou indirects) et de mesurer le lien dose-réponse entre la concentration tissulaire et les conséquences sur un organe cible.

La dose déposée dans les tissus peut être quantifiée par spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Elle permet une analyse très sensible des éléments, métaux ou métalloïdes, dans diverses matrices biologiques complexes. Les tissus sont préparés pour ensuite être analysés par ICP-MS pour quantifier un élément constitutif du composé d'intérêt. Par exemple, le titane peut être utilisé comme signature élémentaire de la présence de TiO_2 dans les tissus. Le plasma à couplage inductif est une source d'ionisation puissante qui décompose l'échantillon en ions, qui peuvent être séparés par application d'un champ électromagnétique provoquant leur discrimination en fonction de leur masse atomique et de leur charge électrique.

La technique LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) peut également être utilisée pour visualiser spatialement la distribution élémentaire dans les tissus. Cette technologie est notamment utilisée pour l'analyse *in situ* des nanoparticules métalliques dans les organes cibles (Leprince et al., 2019). L'analyse LIBS est applicable sur des échantillons solides, liquides ou gazeux, pour permettre une analyse élémentaire grâce à une impulsion laser. Elle est sensible (quelques ppm) et sa résolution spatiale peut descendre jusqu'à 8 µm. La technique consiste à utiliser un laser de haute énergie pour dissocier, vaporiser et ioniser l'échantillon. La lumière émise est ensuite analysée à l'aide d'un spectromètre pour obtenir son spectre d'émission. Cependant, sa limite de quantification est plus élevée que celle de l'ICP-MS, la technique est coûteuse et complexe à mettre en œuvre.

2.3. Caractérisation physico-chimique des aérosols

Certains paramètres essentiels doivent être caractérisés lors de la mise en place d'une étude nanotoxicologique par inhalation afin de répondre aux exigences mentionnées précédemment (Oberdörster, 2000; Oberdörster and Kuhlbusch, 2018), à savoir : la distribution granulométrique des aérosols, morphologie, composition, état d'agglomération et d'agrégation, concentration massique, concentration en nombre, paramètres environnementaux, homogénéité de l'atmosphère d'exposition, méthode de production des aérosols, et caractéristiques de la chambre d'exposition utilisée.

2.3.1. Distribution granulométrique des aérosols

2.3.1.1. Principe

La distribution granulométrique correspond à la distribution en taille des particules d'un aérosol. En général, les aérosols sont formés d'un ensemble de particules dites polydispersées, dans la mesure où elles forment un continuum de tailles plus ou moins étendues entre deux valeurs limites. Ce paramètre rend compte de la probabilité qu'une particule tirée au sein d'une population ait un diamètre défini, elle se représente généralement sous la forme graphique d'un histogramme, décrivant le spectre de fréquence

des différentes tailles prises par les particules d'un aérosol. Cette représentation permet de mettre en évidence la proportion en nombre, en surface, ou en masse des particules en fonction de leur diamètre (Figure 26).

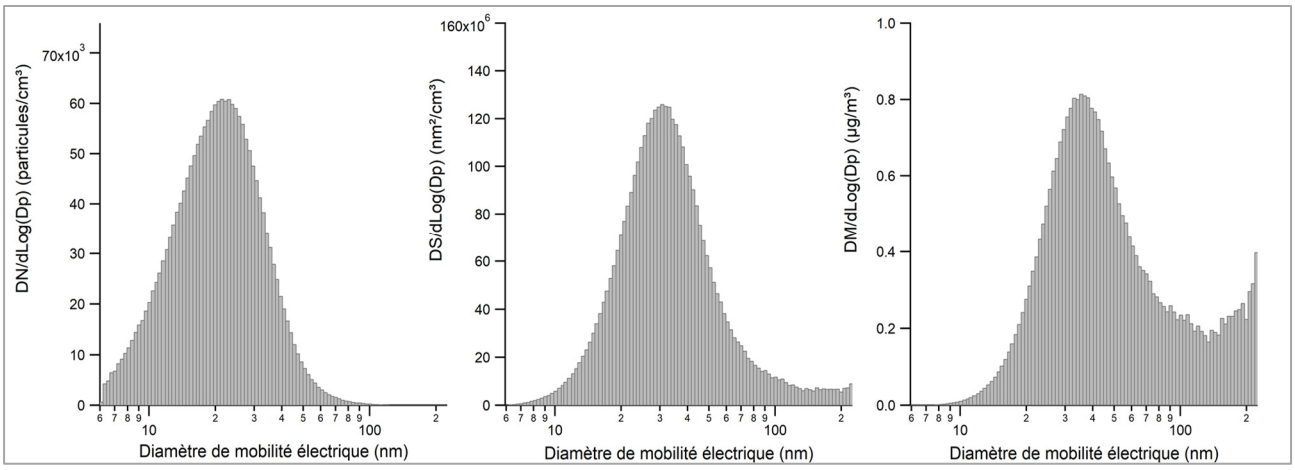


Figure 26. Représentations de la distribution granulométrique des particules d'un aérosol de $nTiO_2$ suivant les distributions (de gauche à droite) en nombre, en surface spécifique et en masse (mesures réalisées au SMPS). Différents paramètres statistiques peuvent être calculés (mode, moyenne, médiane…). Les courbes obtenues suivent généralement une loi log-normale. En abscisse figure le logarithme du diamètre particulaire, et en ordonnée la loi de probabilité normale, proportionnelle à la fréquence cumulée en particules.

L'étendue de la distribution granulométrique d'un aérosol est caractérisée par l'écart type géométrique, ou GSD (*geometric standard deviation*). Ce paramètre décrit l'étendue du continuum de tailles des particules d'un aérosol. Ainsi, l'écart type géométrique tend vers un lorsque l'aérosol est monodispersé. À l'inverse, il augmente avec son degré de dispersion. De façon général, un aérosol est dit monodispersé si le GSD < 1,25. Dans le cas contraire, il est dit polydispersé.

La plupart des modèles ont été établis sur des modèles de sphères alors que les particules d'un aérosol ne sont pas sphériques. C'est pourquoi on raisonne en termes de diamètres équivalents, afin de conserver la validité des différents modèles. On peut donc considérer une sphère théorique ayant des propriétés communes avec les particules étudiées. Plusieurs types de diamètres sont utilisés pour rendre compte de la distribution granulométrique (Figure 27). Le diamètre médian en nombre ou *count median diameter* (CMD) sera principalement utilisé dans ce manuscrit.

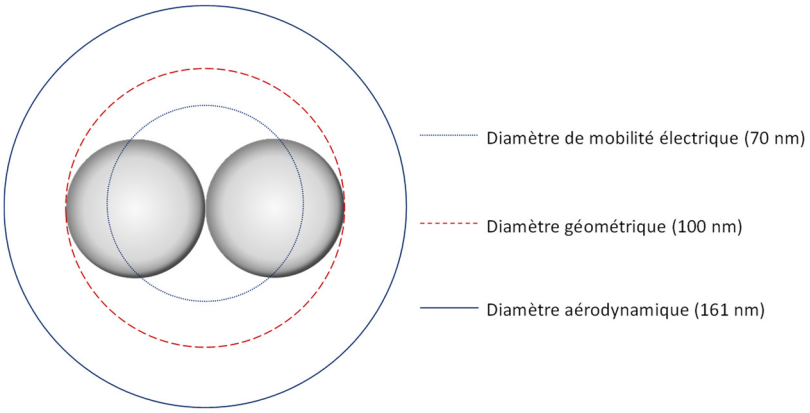


Figure 27. Représentation des diamètres équivalents d'un agglomérat composé de deux particules sphériques de 50 nm, ayant une masse volumique de 4000 kg/m³ (adapté du travail de thèse de Romain Guichard). **Diamètre aérodynamique** : correspond au diamètre d'une sphère modèle de masse volumique égale à celle de l'eau (1000 kg/m³), ayant une vitesse de sédimentation identique à celle de la particule considérée. **Diamètre de mobilité électrique** : correspond au diamètre d'une sphère portant la même charge électrique que la particule considérée, et donc ayant la même mobilité électrique lorsqu'elle est soumise à un champ électrique Ces deux paramètres sont très courants en métrologie des aérosols, car le principe de fonctionnement de certains appareils est établi sur ces dimensions. On peut également citer les diamètres équivalents en volume, le diamètre de Stokes et le diamètre géométrique, qui ne sont pas abordés dans ce manuscrit.

2.3.1.2. Mesure

Pour caractériser la distribution granulométrique d'un aérosol, il existe des méthodes optiques établies sur la diffusion laser, qui estiment la taille d'une particule par mesure de la diffusion d'un faisceau lumineux, des méthodes dynamiques qui utilisent l'impaction inertielle afin de sélectionner les particules en fonction de leur taille et également des méthodes par mobilité électrique. Deux instruments de mesure sont généralement utilisés pour évaluer la taille des particules dans deux gammes de taille différente : le SMPS (*Scanning mobility particle sizer*) pour des mesures en termes de diamètre de mobilité électrique entre quelques nanomètres et 1µm et l'APS (*Aerodynamic Particle Sizer*) pour des mesures en termes de diamètre aérodynamique entre 600 nm et 20µm

2.3.2. Morphologie et composition, état d'agglomération et d'agrégation

Les particules d'un aérosol peuvent avoir des formes variées. Pour déterminer leur morphologie, deux catégories de microscopes électroniques se distinguent, le Microscope Électronique à Balayage (MEB) et le Microscope Électronique en Transmission (MET). Le MEB permet d'analyser l'échantillon étudié grâce à un faisceau d'électrons concentré sur sa surface. La technique de spectroscopie X par dispersion d'énergie (EDX) est souvent couplée à la MEB (Egerton, 2011). Cette technique consiste à focaliser un faisceau d'électrons à la surface de l'échantillon, ce qui engendre une ionisation des atomes. En se désexcitant, ceux-ci vont alors émettre des photons X dont la signature énergétique est

caractéristique de l'atome émetteur. Les rayons X émis permettent d'obtenir une signal correspondant à la composition chimique élémentaire des matériaux étudiés avec une résolution spatiale donnée.

2.3.3. Concentration totale particulaire

2.3.3.1. Concentration massique

La concentration en masse, ou concentration massique, est une donnée fondamentale permettant de quantifier l'exposition à un aérosol, afin d'évaluer la relation dose-réponse (entre niveau d'exposition et effets toxiques). C'est la métrique utilisée de façon conventionnelle pour caractériser les niveaux d'exposition en milieu professionnel ou des populations aux polluants atmosphériques[16]. Exprimée en mg d'aérosol par m³ d'air respiré, elle est associée à la distribution granulométrique des particules étudiées pour estimer la pénétration dans les différentes régions des voies aériennes (INERIS 2004), exception faite des fibres ayant un critère de quantification différent qui repose sur le nombre de fibres par unité de volume. La concentration massique peut être mesurée par des techniques en temps réel ou indirectes (*a posteriori*).

La collection sur filtre est une méthode *a posteriori* qui consiste à prélever un échantillon représentatif de l'aérosol d'intérêt sur un support filtrant. L'aérosol est prélevé au travers d'un échantillonneur, composé d'un porte-filtre permettant le dépôt des particules, et parfois d'une tête de prélèvement (cyclone, impacteurs…) qui permet de sélectionner une granulométrie désirée. Le problème principal lié à cette technique réside dans la présence potentielle d'artéfacts d'échantillonnage qui ne sont pas liés à la génération de l'aérosol (espèces gazeuses ou particulaires issues de sources de contamination et piégées dans le filtre). C'est une méthode simple, mais qui nécessite de réaliser des prélèvements sur une durée suffisamment longue pour mesurer une masse suffisante, sans rendre compte de l'évolution temporelle de la concentration massique.

Certains instruments de mesure permettent le suivi en temps réel de la concentration massique. Le TEOM (*Tapered Element Oscillating Microbalance*) est un appareil composé d'une microbalance, permettant le dépôt des particules sur un élément conique oscillant. L'instrument de mesure intègre en temps réel les variations de la fréquence d'oscillation du cône, qui est convertie automatiquement en variation de masse (Patashnik and Rupprecht, 1990). C'est un instrument de référence pour mesurer les aérosols, qui est notamment très répandu au sein du réseau national Français de surveillance de la qualité de l'air. Cependant, c'est un appareil coûteux, encombrant et difficile à utiliser au long terme en animalerie.

[16] Directive européenne 2008/50/CE 21/05/2008

2.3.3.2. Concentration en nombre

La concentration en nombre des particules compte parmi les métriques essentielles pour caractériser les effets nanotoxicologiques des aérosols (Wang et al., 2011). Les Compteurs de Noyaux de Condensation, ou *Condensation Particle Counter* (CPC), sont des instruments optiques qui mesurent en temps réel la concentration en nombre des particules. De nombreux instruments existent, parmi lesquels différents appareils compacts portables dédiés aux mesures faites sur le terrain. Ils permettent le comptage des particules au moyen d'un faisceau lumineux incident, très souvent un laser, couplé avec un photodétecteur. En fonction des modèles de CPC, la gamme de tailles et de concentrations particulaires mesurées est variable. Généralement, leur gamme de fonctionnement comprend une taille comprise entre quelques nanomètres et quelques micromètres, pour des concentrations allant jusqu'à 10^7 particules/cm³ pour certains modèles (Bau and Witschger, 2016).

2.3.4. Outils de caractérisation des aérosols

Des outils métrologiques adaptés sont nécessaires pour caractériser les aérosols utilisés au cours des études toxicologiques par inhalation. Aucune méthode de mesure ne permet à elle seule d'évaluer toutes les caractéristiques physico-chimiques d'un aérosol de NM. Ainsi, un banc multi-instrumental associant plusieurs instruments de mesure complémentaires est nécessaire. Un bilan non-exhaustif des méthodes adaptées à la caractérisation physico-chimique des aérosols est ainsi présenté (Tableau 10).

Tableau 10. Exemple de méthodes de caractérisation physico-chimiques des aérosols.

Métrique	Méthode	Principe
Concentration massique	Porte-filtre	Mesure indirecte : prélèvements gravimétriques sur filtre, utilisation de la différence de masse avant et après dépôt des particules
	TEOM	Mesure en temps réel : décroissance induite de la fréquence oscillatoire en fonction du dépôt en particules
Concentration en nombre	CPC	Mesure en temps réel : condensation de vapeur sur les particules puis détection par un détecteur optique (laser)
Concentration tissulaire	ICP-MS	Quantification élémentaire en titane dans un tissu
	LIBS	Analyse semi-quantitative de la répartition spatiale en titane dans un tissu
Distribution granulométrique	SMPS	Mesure du diamètre de mobilité électrique des particules uniformément chargées puis discriminées en fonction de leur taille : de quelques nanomètres à ~ 1 µm
	APS	Mesure du diamètre aérodynamique sur la base de l'inertie des particules accélérées puis détectées optiquement grâce à 2 faisceaux : de 0,6 µm à 20 µm
Morphologie	MEB	Balayage de l'échantillon par un faisceau électronique pour reconstruire sa topographie grâce à la mesure de l'émission d'électrons secondaires
Composition	EDX	Mesure de la composition chimique élémentaire avec une résolution spatiale

2.4. Choix et contrôle des conditions expérimentales

Chaque dispositif possède ses propres exigences expérimentales guidant les choix de sa conception. Par exemple, les études toxicologiques classiques ne sont pas adaptées à l'évaluation de la toxicité des NM, à cause des propriétés nouvelles associées à l'échelle nanométrique qui nécessite de prendre en compte la nature physico-chimique des NM. Il est donc indispensable de considérer les différents paramètres influençant la qualité d'une étude nanotoxicologique par inhalation afin de procéder à des choix pertinents lors de la mise en place d'un dispositif d'exposition adéquat. Les systèmes de contrôle des aérosols au sein de l'enceinte où se trouvent les animaux sont essentiels à l'évaluation de la stabilité et l'homogénéité de l'atmosphère d'exposition, en particulier pour mesurer la dosimétrie associée aux particules générées.

2.4.1. Environnement, caractéristiques de la chambre et modalités d'exposition

Pour vérifier que le système d'inhalation permet de subvenir aux besoins physiologiques élémentaires des animaux, il est nécessaire de caractériser les paramètres environnementaux de la

chambre d'exposition (température, pression, renouvellement et humidité de l'air) ainsi que ses caractéristiques (surface, volume, matériaux utilisés etc.). D'une façon générale, il ressort une utilisation très majoritaire des rongeurs exposés autant par des méthodes « nez seul » que corps entier. Bien que la description des méthodes de génération et d'exposition soit rarement fournie de façon exhaustive, les matériaux utilisés pour le confinement des animaux sont le verre, l'acier inoxydable, l'aluminium, le polycarbonate et le polysulfone, et les chambres sont le plus souvent transparentes pour permettre un suivi visuel des animaux. Les matériaux conducteurs, bien que plus coûteux et contraignants, ont l'avantage d'éviter l'accumulation de charge électrostatique aux parois pouvant provoquer la précipitation électrostatique des aérosols. Les températures décrites durant les expositions s'étalent de 17° C (Bermudez et al., 2004) à 27°C (Stone et al., 2017). Cependant, il est préférable d'avoir une température similaire entre la chambre d'exposition et l'animalerie (située entre 22 - 24°C) afin de minimiser les échanges thermiques, pour éviter le stress thermique des animaux et provoquer des mouvements de convection pouvant être une source supplémentaire d'hétérogénéité de l'atmosphère. L'humidité est également soumise à une forte variabilité, de 25% (Grassian et al., 2007) à 70% (Ma-Hock et al., 2009), qui découle majoritairement du type de nébuliseur choisi (voie humide/voie sèche).

Les conclusions d'une étude dépendent grandement de la pertinence de la dose d'exposition sélectionnée et de la sensibilité des modèles utilisés, dont les choix ne sont que rarement rapportés ou justifiés par leurs auteurs (Boyes and van Thriel, 2020). Par ailleurs, les choix expérimentaux (caractéristiques de l'exposition, choix des doses et de la durée) sont également souvent omis, ce qui pose un problème quant à l'interprétation des résultats expérimentaux. Un exemple flagrant est celui de l'étude de Wang et al., (2008), qui de façon intéressante a évalué la neurotoxicité et l'accumulation cérébrale du $nTiO_2$ au niveau des bulbes olfactifs chez la souris. Toutefois, il est notable que cette étude comporte un choix plus que discutable des doses d'instillation intranasale, qui atteignent jusqu'à 7,5 mg de $nTiO_2$ par souris en 30 jours (soit environ 375 mg/kg). La plupart des auteurs utilisent des doses de l'ordre de 1 à 100 mg/kg de $nTiO_2$. Des doses aussi massives sur des temporalités aussi courtes ne peuvent être envisagées dans le cadre d'une exposition réaliste chez l'être humain. Par ailleurs, les instillations nasales répétées représentent une méthode d'exposition pouvant induire des biais expérimentaux non pris en compte par leurs auteurs, comme la possibilité d'altérer l'intégrité de l'épithélium nasal des rongeurs, ce qui peut provoquer un passage particulaire facilité vers le SNC.

2.4.2. Difficultés expérimentales

Il existe plusieurs difficultés couramment rencontrées lors de la mise en place d'une chambre d'exposition (Dorato and Wolff, 1991). Les variations des paramètres environnementaux sont la source de conditions inhabituelles de traitement des animaux (flux d'air, bruit, température, manipulation etc.) qui provoquent un stress préjudiciable à la qualité de l'étude. Le nombre d'animaux dans la chambre,

exprimé en pourcentage par rapport au volume disponible, peut affecter les concentrations d'exposition et la concentration atmosphérique de déchets métaboliques (déchets ammoniaqués et dioxyde de carbone) qui sensibilisent les animaux à l'effet des toxiques. Ainsi, il est recommandé de ne pas dépasser 5% du volume totale de la chambre d'exposition (Silver, 1946). Les chambres d'inhalation peuvent comporter des fuites (jonctions, arrivées/sorties…), des pertes aux parois par effets électrostatiques, ou des zones de stagnation, qui peuvent mener à l'augmentation de l'homogénéité spatiale des concentrations en aérosol. Il est donc important de veiller à ce qu'il y ait des débits en air suffisants pour contribuer à la bonne homogénéisation de l'atmosphère de la chambre. Par ailleurs, il faut porter une attention particulière à la direction et la puissance des flux d'air dans l'enceinte, car les animaux sont sensibles au stress induit par les courants d'air. Les rongeurs sont par exemple attirés par les zones à faible renouvellement d'air (Prusaczyk and Fischer, 1983), ils auront donc tendance à s'entasser dans les zones les moins ventilées, ce qui peut avoir comme incidence d'empêcher l'exposition homogène de l'ensemble des animaux.

2.4.2.1. Stabilité et homogénéité de l'atmosphère

La stabilité d'une exposition est un paramètre important qui doit être caractérisée en analysant l'homogénéité de l'atmosphère. C'est l'une des sources principales de variabilité au cours d'une étude par inhalation, dont les causes peuvent être nombreuses. Elle repose notamment sur le principe de fonctionnement du système d'exposition (type de générateur d'aérosols, géométrie de la chambre d'exposition…), ses conditions de mise en place (expérimentateur, comportement des animaux) et l'aérosol étudié. Plusieurs auteurs ont souligné l'importance de sa prise en compte (Dorato and Wolff, 1991; Lucci et al., 2020; Phalen, 2009). D'une façon générale, l'efficacité mesurée dans l'homogénéisation des chambres d'exposition est très variable. Les chambres d'exposition corps entier possèdent une variabilité de leur atmosphère qui tend à être plus importante, notamment à cause de leur taille supérieure, bien que les résultats dépendent grandement des choix expérimentaux réalisés par leurs auteurs.

À ce titre, concernant les dispositifs d'exposition « nez seul », Yeh et al. (1990) ont mesuré une variabilité spatiale et temporelle de la concentration massique inférieure à 10% dans leur système d'exposition (96 ports), notamment en nébulisant un aérosol de $nTiO_2$. De la même façon, Pauluhn (1994) a validé un système d'inhalation (100 ports) en mesurant une variation spatiale de la concentration de 7,7%, attribuable à la variation quotidienne de la solution utilisée pour la génération de l'aérosol (3,1%) et à la technique analytique pour déterminer la concentration massique (3,9%). Plus récemment, Oldham et al. (2009) et Mainelis et al. (2013) ont rapporté respectivement une variabilité spatiale de 10% et 12% des concentrations massiques dans leur chambre d'exposition.

Concernant spécifiquement les dispositifs d'exposition corps entier caractérisés en utilisant du $nTiO_2$, Yi et al. (2013) ont rapporté une homogénéité spatiale particulièrement faible pour une chambre d'exposition corps entier, ils ont mis en place une chambre d'exposition de 500 L dédiée à l'exposition de 64 rats, qui a permis d'obtenir une déviation spatiale de la concentration massique inférieure à 6% (débit de 112 L/min). Baisch et al. (2014) ont obtenu un écart type relatif de 12% associé aux concentrations massiques mesurées durant 4 jours consécutifs d'exposition chez le rat, en utilisant une chambre d'exposition de 60 L (débit de 35 L/min). Également, Grassian et al. (2007) ont rapporté l'utilisation d'une chambre d'exposition de 65 L (24 souris, débit de 25 L/min), dont l'écart type relatif mesuré était de 22% (concentration massique de 8,88 ± 1,98 mg/m³).

2.4.2.2. Modélisation de l'homogénéité de l'atmosphère

En dehors du système de génération et de la caractérisation précise des aérosols, la distribution des aérosols au sein du système d'exposition doit également être soigneusement évaluée. Les processus d'agglomération et les pertes aux parois peuvent modifier considérablement l'aérosol entre leur génération et leur inhalation par les animaux (Oberdörster et al., 2015).

Beaucoup de paramètres peuvent déterminer l'homogénéité de l'atmosphère de la chambre d'exposition : la géométrie, la taille de la chambre, le type d'injection, les débits d'air entrant/sortant, le pourcentage d'animaux par rapport au volume disponible etc. C'est pourquoi certains auteurs ont utilisé des outils de simulation de dynamique des fluides, appelé modèle CFD (*Computational Fluid Dynamics*), pour modéliser les concentrations et les mouvements des particules à l'intérieur de l'enceinte d'exposition. Oldham et al. (2004) ont été les premiers à évaluer la stabilité atmosphérique par cette méthode dans leur chambre d'exposition corps entier. De façon similaire, Jeon et al. (2012) ont évalué la stabilité dans un système d'exposition « nez seul », en comparant les valeurs simulées avec les données expérimentales. Une variation de 10% dans les concentrations a été rapportée. La simulation de dynamique des fluides permet à la fois de vérifier la pertinence des choix réalisés pour concevoir la chambre d'exposition, et la cohérence entre les concentrations particulaires expérimentales et simulées. Cette modélisation CFD peut se faire en connaissance des caractéristiques des aérosols et de leur vitesse d'écoulement, en utilisant des logiciels tels que COMSOL Multiphysics®. Ainsi, l'intérêt de cette méthode est d'évaluer les performances d'une enceinte d'exposition pour valider les choix expérimentaux réalisés lors de sa conception.

2.5. Les dispositifs d'exposition corps entier dans le paysage scientifique actuel

Au regard des éléments précédemment mis en lumière, il apparaît que les dispositifs corps entier constituent le mode d'exposition le plus pertinent, afin d'éviter la contention des animaux dans le cadre

d'études réalisées durant le neurodéveloppement. En outre, ils diminuent le risque de biais expérimental possiblement induit par le stress animal lors des expositions. Ainsi, un état de l'art présentant les dispositifs d'exposition corps entier utilisés dans les études de nanotoxicologie est présenté (Tableau 11), afin d'identifier quelles seraient les pistes d'optimisation possible pour proposer un dispositif d'étude des effets neurotoxiques et neurodéveloppementaux des NM en mélange avec des pesticides.

Référence	Système de génération	NM (exposition)	Concentration moyenne (écart-type relatif)	Paramètres non-pris en compte dans l'étude
(Baisch et al., 2014)	JET-O-MIZER®	$nTiO_2$ (4 h/jour, 4 jours)	33 mg/m³ (± 12%)	Concentration en nombre, suivi temps réel, échelle « nano » des aérosols (diamètre médian ~ 1 µm), paramètres environnementaux, caractéristiques enceinte, homogénéité atmosphère
(Oyabu et al., 2007)	Nébuliseur à ultrason	NP de Nickel (6 h/jour, 4 semaines)	1.10^5 particules/cm³ (± 50%)	Concentration en masse, suivi temps réel, paramètres environnementaux, caractéristiques enceinte, homogénéité atmosphère
(Gillespie et al., 2010)	Synthèse directe	NP de Nickel (5 h/jour, 5 mois)	125 µg/m³	Concentration en nombre, suivi temps réel, paramètres environnementaux, caractéristiques enceinte, homogénéité atmosphère, dispersion des données
(Morris-Schaffer et al., 2019)	Décharge électrique	Carbone ultrafin (4 h/jour, 8 jours)	50 µg/m3	Suivi temps réel, concentration en nombre, homogénéité atmosphère, caractéristiques enceinte, dispersion des données
(Myojo et al., 2011)	Atomiseur	Fullerènes C60, C70, C76 (6 h/jour, 4 semaines)	0,12 mg/m³ (± 25%)	Concentration en masse et en nombre, suivi temps réel, paramètres environnementaux, caractéristiques enceinte, homogénéité atmosphère
(Sung et al., 2011)	Chauffeur céramique	NP d'or (6h/jour, 90 jours)	21 µg/m³ (± 4%)	Concentration en masse, paramètres environnementaux, caractéristiques enceinte, homogénéité atmosphère
(Adamcakova-Dodd et al., 2015)*	Nébuliseur	NP de Cuivre (4 h/jour, 17 jours)	3,5 mg/m³ (± 34%)	Concentration en nombre, suivi temps réel, homogénéité atmosphère, paramètres environnementaux
(Grassian et al., 2007)*		$nTiO_2$ (4 h/jour, 10 jours)	8,88 mg/m³ (± 22%)	
(Yi et al., 2013b)	Générateur voie sèche	$nTiO_2$ (4 h/jour)	6 mg/m³ (± 6%)	Concentration en nombre, homogénéité atmosphère, caractéristiques enceinte
(Yin et al., 2014)	Nébuliseur	$nTiO_2$ (8 h/jour, 3 semaines)	6,34 mg/m³ (± 3%)	Concentration en nombre, paramètres environnementaux, caractéristiques enceinte
(Okada et al., 2019)	Générateur voie sèche	$nTiO_2$ (6h/jour, 4 semaines)	4,1 mg/m^3 (± 16%)	Homogénéité atmosphère, concentration en nombre
(Bermudez et al., 2004)	Brosse rotative	$nTiO_2$ (6 h/jour, 13 semaines)	10,8 mg/m³ (± 9%)	Homogénéité atmosphère, paramètres environnementaux
(Koivisto et al., 2011)	Synthèse directe	$nTiO_2$ (4 h/jour, 5 jours)	De 0,8 à 28,5 mg/m³ (de ± 25% à ± 3%)	Homogénéité atmosphère, paramètres environnementaux

*Issues d'une caractérisation initiale du dispositif par (O'Shaughnessy et al., 2003).

Tableau 11. Études nanotoxicologiques utilisant une chambre d'exposition aux aérosols corps entier chez le rongeur. Cette liste n'est pas exhaustive, les études détaillant suffisamment les matériels et méthodes utilisés ont été sélectionnées. La concentration moyenne correspond à celle rapportée par les auteurs durant les expositions pour mesurer les doses reçues par les animaux. La taille des enceintes d'exposition varie grandement, de 60 L (Morris-Schaffer et al., (2019); Baisch et al., (2014)) à 1300 L (Sung et al., 2011).

Caractérisation Physico-chimique des aérosols

Au vu du paysage scientifique actuel, il apparaît certaines lacunes récurrentes dans les paramètres rapportés dans les études par inhalation, notamment en termes de mesure de la concentration en nombre, du suivi en temps réel de la génération des aérosols et des caractéristiques des dispositifs utilisés (nombre animaux, exposition en groupe ou en enclos séparés, surface disponible etc.). Certains point-clés sont souvent absents, comme les paramètres environnementaux (température, renouvellement d'air, humidité, pression) et la mesure de l'homogénéité de l'atmosphère d'exposition. Par ailleurs, la variabilité des concentrations lors des expositions n'est pas toujours rapportée, et celles-ci peuvent aussi atteindre un niveau non conforme au seuil maximal de 20% exigé dans le cadre des expositions aux aérosols de particules solides ou liquides. Un dispositif devrait idéalement incorporer ces différents paramètres (OECD TG 403, 412, 413)[17,18].

Il doit aussi permettre une manipulation aisée en animalerie, où l'incorporation de façon pérenne d'un banc multi-instrumental de caractérisation métrologique pour l'étude chronique est difficile à mettre en place. Ainsi, après une première phase de caractérisation du dispositif d'exposition, un contrôle allégé peut être mis en œuvre durant la phase d'expérimentation animale. Il permet d'assurer un suivi métrologique en temps réel du bon déroulement de la génération des aérosols pour être comparé aux données produites lors de la caractérisation. Enfin, la caractérisation des aérosols et de l'homogénéité de l'atmosphère permet d'estimer la dose d'exposition reçue par les animaux, paramètre indispensable à l'évaluation du risque sanitaire.

[17] NF EN 16966 : Exposition sur les lieux de travail — Mesurage de l'exposition par inhalation de nano-objets et de leurs agrégats et agglomérats.
[18] ISO 10808:2010 : Nanotechnologies — Caractérisation des nanoparticules dans les chambres d'inhalation par exposition pour les essais de toxicité par inhalation.

IV. Conclusions de la partie

Au cours de ce chapitre, nous avons vu que les promesses technologiques des NPe séduisent et conduiront à l'augmentation de leur utilisation. Pour l'heure, les NPe développés consistent majoritairement en la reformulation de SA déjà utilisées au sein de l'agriculture conventionnelle. Ces produits concernent de nombreuses familles chimiques de SA et un grand nombre de NM, ce qui nécessite donc un apport important de données toxicologiques. Cependant, il existe beaucoup de sources d'interrogation liées à leur définition et l'évaluation de leur risque sanitaire, qui pour l'instant n'ont pas encore été abordées de façon harmonisée par les agences sanitaires. Les difficultés métrologiques inhérentes à leur caractérisation physico-chimique, ainsi que la complexité du comportement des NM dans l'environnement, doivent motiver le développement d'outils d'évaluation pouvant estimer le risque associé aux différentes voies d'exposition. Les leçons tirées de l'étude de la neurotoxicité des pesticides, doivent également encourager à évaluer spécifiquement les effets des NPe sur le SNC. Par ailleurs, il a été montré que l'interaction des NM avec des polluants peut provoquer une augmentation de la toxicité du mélange. La combinaison de substances mises en jeu dans la formulation d'un NPe pourrait donc potentiellement induire des effets cocktails pour l'instant inconnus, qu'il convient d'aborder par l'évaluation des effets des substances seules ou en mélange. Même s'il est difficile de savoir quels types de NM seront incorporés dans les NPe de demain, il est essentiel de proposer des modèles d'étude des NPe par inhalation. Au sein du paysage des NM, le $nTiO_2$ occupe une place de premier choix. En plus de son utilisation comme NPe potentiel, les concentrations environnementales en $nTiO_2$ sont amenées à augmenter dans les années à venir, notamment à cause de ses nombreux usages qui mènent à son accumulation dans les différents compartiments de l'environnement. Son usage généralisé et ses propriétés de nombreuses fois décrites dans la littérature, le placent comme un NM de référence pour les études nanotoxicologiques.

Les études toxicologiques et épidémiologiques convergent vers un lien possible entre l'exposition aux NM et les maladies neurodégénératives. L'effet le mieux décrit dans l'exposition à certains NM est le déclenchement d'un stress oxydant et d'une neuroinflammation pouvant altérer le fonctionnement neuronal. Par ailleurs, l'activation des cellules microgliales et l'expression de signaux pro-inflammatoires peuvent entrainer au long terme des dommages irréversibles sur le SNC. Néanmoins, les effets neurotoxiques des NM par inhalation sont encore méconnus. Par conséquent, la présence croissante de NM dans des produits pulvérisés tels que les NPe pose la question de leurs éventuels effets sanitaires. Étant donné les capacités de régénération limitée du SNC, il est important de considérer à la fois la bioaccumulation potentielle des NM, ainsi que leur neurotoxicité lors d'inhalation répétées, particulièrement pour les NM stables et insolubles tels que le $nTiO_2$. Une attention particulière doit être portée aux populations vulnérables (période gestationnelle ou stades précoces) et chez les populations

susceptibles de développer des maladies neurodégénératives (familles agriculteurs, personnes âgées). À ce titre, la phase développementale est une période critique à la sensibilité exacerbée, et une altération à ce stade peut prédisposer à la toxicité d'expositions survenant ultérieurement au cours de la vie d'un individu. Ainsi, les stades précoces comme le stade fœtal, doivent être pris en compte de façon prioritaire dans l'étude de la neurotoxicité des NM émergents. Le PQ est capable d'induire chez l'animal des lésions cérébrales semblables à celles identifiées dans le tableau clinique de la MP. En outre, sa neurotoxicité peut être augmentée par la présence d'autres composés pouvant avoir un mécanisme d'action similaire, notamment par l'induction d'un stress oxydant. Il provoque en particulier une atteinte des voies dopaminergiques, visibles au niveau du striatum et de la SNpc. Malgré ces éléments, les effets neurotoxiques du PQ par inhalation aux doses faibles sont encore méconnus, notamment sur le neurodéveloppement.

Malgré la volonté croissante de diminuer le recours à l'expérimentation animale, les modèles *in vivo* restent pour l'heure incontournables pour évaluer les effets de l'inhalation d'aérosols. Les études caractérisant la neurotoxicité des NM par inhalation sont encore peu nombreuses. Elles reposent sur des modèles hétérogènes, lacunaires, voire inadaptés à l'étude de l'exposition chronique. Selon leur méthode de génération, les aérosols de NM englobent des particules complexes et variées, qui nécessitent une caractérisation métrologique et un suivi au cours du temps, notamment en termes de distribution granulométrique et de concentrations en masse et en nombre. Cette caractérisation permet par ailleurs d'estimer les dépôts particulaires par l'usage d'outils de modélisation à des fins d'extrapolation des doses entre modèles et voies d'exposition. Des choix expérimentaux sont réalisés lors de la mise en œuvre des dispositifs d'exposition, qui peuvent être très différents en fonction de leur finalité. Néanmoins, ils doivent permettre la mise en place de protocoles harmonisés s'inscrivant dans une volonté de développer des approches fiables, reproductibles qui permettent la comparaison inter-études. Plusieurs défis y sont associés, dont l'homogénéité et le contrôle de l'atmosphère d'exposition pour estimer la dose précise délivrée aux animaux, tout en étant en accord avec les exigences de réduction du stress animal. À cette fin, le choix d'un générateur et d'un mode d'exposition doivent être adaptés à un scénario d'exposition pertinent pour répondre à la question de recherche posée. Au vu des dispositifs existants, l'atomiseur couplé avec une enceinte de type corps entier semble permettre la génération d'aérosols de façon stable, dans une large gamme de concentrations en $nTiO_2$, afin d'exposer des modèles de souris à plusieurs stades de leur développement, en particulier lors de la gestation.

V. Objectifs de la thèse

Afin d'évaluer le risque sanitaire associé aux NPe, nous avons vu au cours ce chapitre qu'il est nécessaire de considérer des paramètres spécifiques pour la réalisation d'études par inhalation. Celles-ci doivent également prendre en considération l'exposition pendant les périodes de vulnérabilité, en approfondissant les connaissances sur la neurotoxicité des mélanges et des faibles doses à la dosimétrie contrôlée. En outre, la complexité des paramètres physico-chimiques des NM et l'hétérogénéité des protocoles actuellement utilisés, nécessitent un travail d'harmonisation afin de proposer des données reproductibles pouvant être comparées entre les différentes études.

Prenant en compte ces considérations, le projet de recherche interdisciplinaire proposé dans ce manuscrit comporte deux parties. La première partie réalisée au LNE Paris présente la mise en place et la caractérisation métrologique d'une chambre d'exposition aux aérosols, dont le but est de permettre une étude nanotoxicologique *in vivo* mettant en jeu un pesticide, un NM, et leur mélange qui modélise un NPe. En tant que preuve de concept, la seconde partie réalisée à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon présente la réalisation d'une étude chez la souris mise en œuvre grâce au dispositif développé et validé préalablement.

1. Mise en place d'une chambre d'exposition aux aérosols

Cette partie présente les choix expérimentaux réalisés pour mettre en place une chambre d'exposition corps entier aux aérosols et sa caractérisation métrologique. À la suite de la définition d'un scénario d'exposition réaliste et compatible avec l'étude nanotoxicologique, les objectifs pris en compte lors de la mise en place du dispositif sont :

- **Mettre au point un dispositif expérimental de génération d'aérosols** pouvant être utilisé en routine au sein d'une animalerie conventionnelle
- **Caractériser métrologiquement ce dispositif afin de le valider** au regard des exigences associées aux dispositifs d'études toxicologiques par l'inhalation
- **Contrôler les niveaux d'exposition aux aérosols lors des phases expérimentales d'exposition**, grâce à un suivi métrologique permettant l'estimation de la dose reçue par les animaux

2. Étude de la neurotoxicité

Grâce à la mise en place d'un dispositif d'exposition à nos aérosols d'intérêt, cette partie toxicologique a été réalisée en mettant en œuvre deux protocoles expérimentaux chez la souris. Les objectifs de cette étude sont :

- **Évaluer l'effet neurodéveloppemental** d'une exposition précoce durant la gestation
- **Mesurer les effets d'une exposition subchronique** chez l'animal prédisposé au développement d'une maladie neurodégénérative
- **Evaluer la survenue** des effets cocktails potentiels

Une première phase a consisté à analyser les conséquences de l'exposition prénatale sur les cerveaux des souriceaux exposés *in utero* par transcriptomique. Cette méthode permet une analyse globale des changements de l'expression génique, pouvant rendre compte des altérations neurodéveloppementales de façon sensible. Une deuxième phase a été effectuée en utilisant des approches complémentaires d'analyses histologiques et neurocomportementales afin d'évaluer les effets neurotoxiques chez des souris adultes transgéniques mimant l'exposition d'une population vulnérable, ces animaux étant prédisposés au développement d'un syndrome parkinsonien par l'expression d'une forme mutée de l'asyn humaine.

Chapitre 2. Développement et caractérisation métrologique d'un dispositif d'inhalation

Dans ce chapitre, une première partie décrit la mise en place d'un dispositif d'exposition aux aérosols, suivie en seconde partie de sa caractérisation métrologique, présentée sous la forme d'un article publié dans la revue *Aerosol and Air Quality Research*. Une dernière partie présente les résultats complémentaires, la discussion et les conclusions du chapitre.

VI. Mise en place du dispositif : section méthodologique

1. Modèle de NPe

Étant donné que la majorité des NPe actuellement identifiés sont constitués d'un mélange d'une SA conventionnelle avec un NM, nous avons choisi l'emploi du PQ comme SA pour proposer un NPe modèle. Malgré des conséquences sanitaires de plus en plus décrites dans la littérature, c'est l'un des herbicides les plus utilisés au niveau mondial. C'est un neurotoxique reconnu chez l'homme comme chez l'animal, mais dont les mécanismes d'action aux faibles doses sont encore mal compris, et non étudiés dans le cadre d'une exposition prénatale par inhalation. Ainsi sa capacité potentielle à induire une neurotoxicité de façon ciblée, sera utilisée comme méthode sensible d'évaluation de la toxicité d'un mélange impliquant un NM qui est également suspecté de jouer un rôle neurotoxique.

De façon complémentaire, le $nTiO_2$ a été choisi. C'est un des NM les plus étudiés, il est utilisé dans de nombreux domaines, et il constitue une source croissante de contamination environnementale aux NM. Par ailleurs, il figure en tête de liste comme substances pouvant être intégrées dans les NPe, car il possède un large spectre d'effets valorisables en agriculture (biocides, fertilisant, photocatalyseur…). À l'avenir, il est donc probable de le trouver dans les formulations de NPe et de nanofertilisants. Les études montrent que le $nTiO_2$ peut causer l'induction d'un stress oxydant et d'une neuroinflammation dans certaines conditions d'exposition à des doses massives, mais ses effets à des doses réalistes par inhalation sont encore mal connus. Le P25 $nTiO_2$ a été spécifiquement choisi comme NM de référence dont les caractéristiques physico-chimiques sont très largement décrites dans la littérature (Ohtani et al., 2010), ce qui en fait un NM modèle adéquat.

Le mélange PQ + $nTiO_2$ présente donc un intérêt double. Premièrement, il comporte deux substances connues pour leur pouvoir oxydant et neuroinflammatoire, qui pourraient potentiellement exercer un effet cocktail sur le SNC à la suite de leur inhalation, notamment via le passage par la muqueuse olfactive. Deuxièmement, il pourrait constituer un NPe aux propriétés attrayantes, car le P25 $nTiO_2$ est capable de provoquer la photocatalyse du PQ, ce qui diminuerait le problème environnemental lié à sa rémanence dans les sols (soucis majeur associé à son utilisation actuelle). Il pourrait également proposer un effet synergiste, les propriétés photocatalytiques du P25 $nTiO_2$ permettant théoriquement de renforcer l'effet du PQ. Cette utilisation correspondrait donc aux avancées recherchées actuellement par l'usage

des NPe : réduction des tonnages de SA, augmentation de leur efficacité, baisse de la dissémination environnementale de la SA.

2. Prérequis

2.1. Exigences

Comme évoqué au cours du premier chapitre, l'élaboration d'un dispositif nécessite de prendre en compte les exigences des lignes directrices de l'OCDE concernant les dispositifs d'inhalation, en considérant également les lacunes métrologiques et réglementaires des dispositifs présents dans le paysage scientifique actuel :

- Pertinence et description du protocole utilisé pour reproduire un scénario d'exposition réaliste
- Réduction du stress induit par les traitements
- Description des paramètres environnementaux (température, renouvellement d'air, humidité)
- Caractérisation des aérosols générés, devant être submicroniques avec un écart-type géométrique inférieur à 3
- Caractérisation des concentrations en nombre et en masse des particules
- Reproductibilité de la procédure de génération (variabilité des concentrations massiques < 20%)
- Homogénéité et stabilité de l'atmosphère
- Suivi en temps réel du déroulement des expositions.

Pour ce faire, une chambre d'exposition a été mise en place pour être associée avec un dispositif de génération d'aérosol adéquat, dont les différents constituants ont également été sélectionnés. La caractérisation métrologique du dispositif a été réalisée au LNE, sur les plateformes MONA (Métrologie Online et offline des NanoAérosols) et CARMEN (CARactérisation MÉtrologique des Nanomatériaux) en utilisant des instruments de mesure de référence permettant de décrire les propriétés essentielles des aérosols générés (concentration en nombre et en masse, morphologie et composition chimique, distribution granulométrique, paramètres environnementaux). À l'inverse, la phase d'exposition des animaux à l'ENSL a été réalisée en utilisant une caractérisation minimale s'appuyant sur les concentrations en nombre et en masse uniquement, pour valider les données issues de la phase de caractérisation effectuée au LNE.

2.2. Concentrations cibles

Concernant le PQ (Sigma Aldrich France, référence 856177), les valeurs de concentrations massiques ayant été rapportées dans la littérature chez le rat montrent que la dose sans effet par inhalation (DSE)

a été estimée à 10 µg/m³ (Laird et al, 1979 ; Hardy et al. 1980) et la dose létale minimale (LC_0) à environ 1000 µg/m³ (Gage 1968). Par ailleurs, la concentration massique maximale recommandée par le NIOSH est de 100 µg/m³ pour la fraction respirable du PQ (OSHA Occupational Chemical Database). C'est pourquoi la concentration de 100 µg/m³ a été choisie afin de minimiser le risque de mortalité chez les animaux exposés au cours de l'étude subchronique, tout en ayant une cohérence avec les doses maximales relevées en milieu professionnel (125 µg/m³, (Morshed et al., 2010)).

Concernant le $nTiO_2$ (Aeroxide P25, 75% anatase 25% rutile, Evonik, Sigma Aldrich), une DSE par inhalation de 2 mg/m³ a été rapportée chez la souris (Ma Hock et al., 2009 ; Bermudez et al., 2004). Il n'y a pas de risque de toxicité aiguë, la LC_0 a été estimée comme étant supérieure à 10 000 mg/m³. Il est impossible de savoir aujourd'hui quels seront les niveaux d'exposition professionnelle résultant de l'utilisation du $nTiO_2$ comme NPe. Cependant, certaines études réalisées sur des sites de production de TiO_2 ont mis en évidence des concentrations d'exposition atteignant 5 mg/m³ (taille particules : 15 - 710 nm) (Lee Ji Hyun et al., 2011) à certains postes de travail. Par conséquent, la concentration cible de 10 mg/m³ a été choisie, car située au-dessus de la DSE tout en étant considérée comme une dose d'exposition faible et réaliste.

La concentration cible du mélange PQ + $nTiO_2$ (0.1 mg/m³ PQ + 10 mg/m³ $nTiO_2$) est établie afin de pouvoir comparer l'effet du mélange, pour l'évaluation de la survenue d'effets cocktail potentiels.

3. Chambre d'exposition

Un dispositif corps entier a été choisi pour permettre des expositions chroniques, adaptées à l'exposition des souris gestantes, tout en ayant l'avantage d'être sans contention et sans anesthésie, cette méthode permettant de minimiser le stress induit par le protocole d'exposition.

Le PQ étant corrosif pour les métaux (WHO, 1984), une cage transparente en polysulfone a été choisie, ce matériau étant utilisé pour sa résistance chimique et son faible coût (Tuttle et al., 2010), tout en permettant de suivre visuellement les animaux durant les expositions. Les cages ventilées utilisées en animalerie à plusieurs niveaux de confinement, sont prévues pour héberger plusieurs types d'espèces animales, tels que les rongeurs. La cage Tecniplast GR900, de 20 L (395×346×213 mm [W×D×H]) a donc été choisie pour satisfaire ces critères. C'est une cage ventilée, ce qui permet de facilement la modifier pour l'associer à un dispositif de génération d'aérosols. Elle est conçue pour l'hébergement des rongeurs (rats, souris, hamsters…) afin de répondre aux besoins physiologiques des animaux. Sa surface au sol permet l'hébergement de 20 souris (pesant entre 20 - 25 g) selon les normes européennes. Cette capacité peut être néanmoins augmentée pour les besoins associés à la réalisation de protocoles d'exposition, les conditions d'expérimentation étant moins strictes que celles d'hébergement.

La Figure 28 présente la cage et les modifications apportées à cette dernière. La conception de l'enceinte par le constructeur permet une ventilation induite par sa géométrie et le placement des ports d'entrée et de sortie des flux d'air. Ils ont été réutilisés pour fixer des tubes permettant l'injection horizontale des aérosols dans l'enceinte. Les ports réservés à l'arrivée d'air (en bleu sur la Figure 28A) ont été dédiés à l'injection de l'aérosol, tandis que ceux réservés à la sortie d'air (en rouge) ont été dédiés à l'extraction de l'aérosol, afin d'augmenter la dispersion de l'aérosol entrant, tout en minimisant sa vitesse d'entrée. Une connexion a également été installée sur le haut de la cage pour permettre un suivi des concentrations particulaires en nombre durant les expositions par prélèvement des aérosols par le haut de la chambre. Un joint en polyuréthane a été ajouté pour rendre étanche l'ensemble formé par le couvercle et le bas de la cage. Il y a deux points de prélèvement des aérosols : l'un est dédié aux mesures gravimétriques (TEOM + porte-filtre), SMPS et APS (Figure 28B, flèche rouge); le deuxième, utilise la connexion située sur le haut de la cage (Figure 28C), dédiée au CPC 3007 et à l'échantillonnage des aérosols pour les mesures par MEB/EDX.

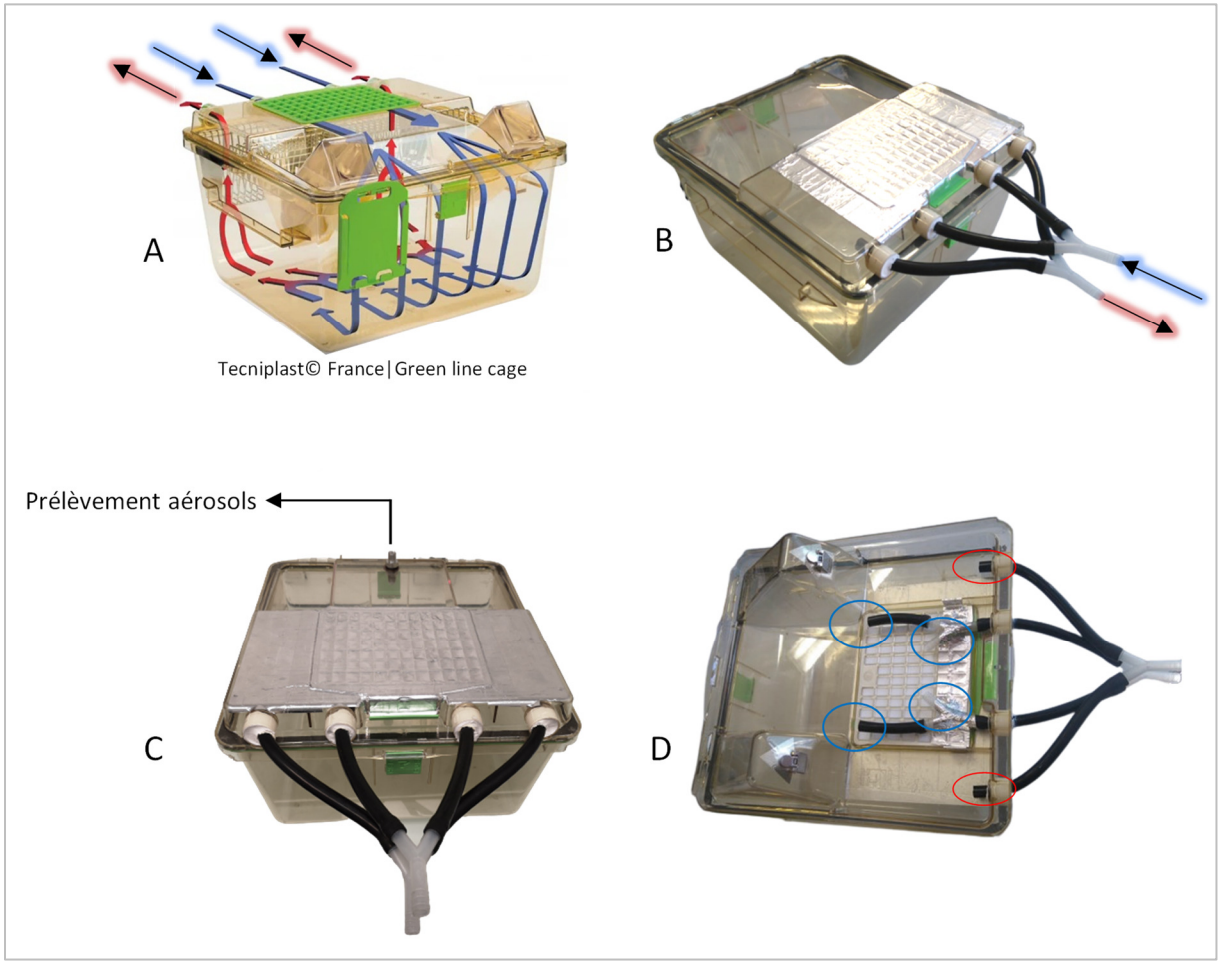


Figure 28. Images de la cage utilisée comme chambre d'exposition corps entier. (A) représentation du constructeur (Tecniplast) pour l'hébergement des animaux en portoir ventilé avec la représentation des flux d'air théoriques. (B et C) photographie de la cage modifiée pour accueillir une connexion permettant le prélèvement des aérosols, et des tuyaux antistatiques en polyuréthane fixés à la cage par des joints en silicone. (D) couvercle de la cage montrant l'injection des aérosols (en bleu) qui est réalisée en 4 points pour maximiser leur dispersion tout en minimisant leur vitesse d'entrée. L'extraction se fait en deux points (en rouge).

4. Dispositif de génération d'aérosols

Le dispositif expérimental de génération et de caractérisation des aérosols dans la chambre d'exposition est présenté en Figure 29. Son principe de fonctionnement et les détails associés à ses différentes parties sont présentés en détail dans les sections dédiées.

4.1. Description

Un compresseur silencieux (SIL AIR PRO 50, niveau sonore : 43 dB) a été choisi afin de minimiser les nuisances sonores durant la phase d'exposition des animaux. Des tubes antistatiques en polyuréthane

ont été utilisés pour permettre de minimiser les pertes aux parois. Le débit d'aérosol fourni par le nébuliseur étant fixe (3,3 L/min), il a été dilué avant son injection dans la chambre d'exposition par un flux d'air filtré (4 L/min) afin d'obtenir un renouvellement d'air suffisant de l'atmosphère de la cage (22 volumes/h). Des filtres à haute efficacité, (filtres HEPA : *High-Efficiency Particulate Air*) ont été utilisés pour éviter la contamination de l'aérosol et pour protéger l'air du laboratoire. Un air de dilution filtré a été utilisé pour l'APS afin d'obtenir des concentrations en nombre inférieures à 10^3 particules/cm^3. Concernant les prélèvements gravimétriques, un porte-filtre utilisant un filtre en microfibres de verre borosilicaté et polytétrafluoroéthylène (PALLFLEX, 47 mm, rétention de 99,97% des particules) a été utilisé. Des régulateurs de débit massique (RDM) ont été disposés afin de réguler les débits dans les différentes parties du système. Une pompe à vide a été utilisée pour induire un débit total sortant de la chambre d'exposition de 7,5 L/min. Le compteur de particule CPC 3007 possède un point de prélèvement sur le couvercle de la cage, et une dilution propre (0,4 L/min) dédiée à prévenir le dépassement de sa gamme de mesure (10^5 particules/cm³).

4.2. Paramètres environnementaux

La température doit idéalement être similaire à celle du laboratoire, pour éviter les mouvements de convection thermique pouvant nuire à l'homogénéisation de l'atmosphère. Également, la température adéquate pour les rongeurs est comprise idéalement à 22°C ± 2°. Cette température est affectée principalement par celle de fonctionnement du compresseur qui augmente au cours du temps. Elle a été mesurée à environ 20°C lors de son allumage, puis elle augmente jusqu'à 70 °C au bout de deux heures de génération en continu. Pour éviter les fuites vers le laboratoire, une légère dépression a été induite dans la chambre d'exposition par l'utilisation d'une pompe à vide.

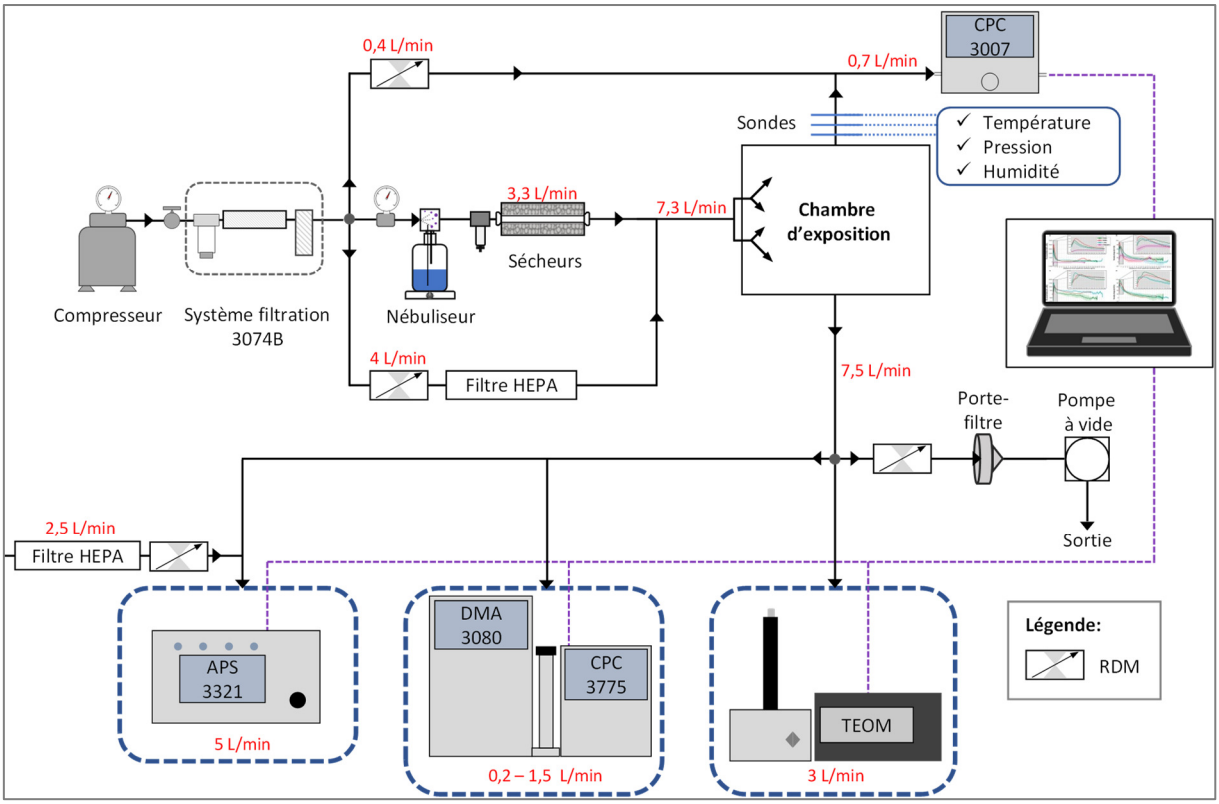


Figure 29. Photographie et schéma du dispositif expérimental de génération et de caractérisation métrologique des aérosols dans la chambre d'exposition en l'absence d'animaux. À l'exception du CPC 3007, les instruments de mesure illustrés (entourés en bleu) ont été utilisés seulement pendant la phase de caractérisation métrologique au LNE Paris. RDM : régulateur de débit massique.

4.3. Générateur – Principe de fonctionnement

Un nébuliseur (générateur d'aérosols par voie humide) a été choisi afin de correspondre au mieux à la pulvérisation des herbicides agricoles qui se fait majoritairement grâce à des buses hydrauliques nébulisant une solution aqueuse contenant les SA, comme dans le cas de l'usage du PQ. Plus particulièrement, un nébuliseur à jet (3076 TSI) a été sélectionné car étant décrit comme permettant la génération d'aérosols à des concentrations élevées et stables en particules, dont la distribution granulométrique est comprise entre quelques nm et quelques microns.

Ce générateur fonctionne selon le principe suivant : l'air comprimé (2,4 bars) est injecté à travers l'orifice d'entrée du nébuliseur pour former un jet à haute vélocité, qui crée par effet Venturi une aspiration de la suspension à nébuliser (Figure 30). Cette dépression permet une circulation du liquide du réservoir vers le jet d'air, provoquant ainsi la pulvérisation d'un nuage de gouttelettes. Seules peuvent sortir les plus fines gouttelettes de l'aérosol, qui est généré à pression ambiante. Au contraire, les gouttes d'une taille plus importante sont impactées sur la paroi du nébuliseur et retournent vers le réservoir (système de recirculation). La pression appliquée au nébuliseur influence la concentration et la distribution granulométrique des gouttelettes générées.

De l'eau ultrapure (résistivité 18,2 MΩ·cm) a été utilisée pour la préparation de suspensions contenant les substances d'intérêt (PQ, nTiO_2) dans un volume totale de 300 mL, contenu dans le réservoir du nébuliseur sous agitation magnétique constante. Cette agitation a permis d'obtenir une suspension colloïdale homogène au cours de la durée de la génération des aérosols.

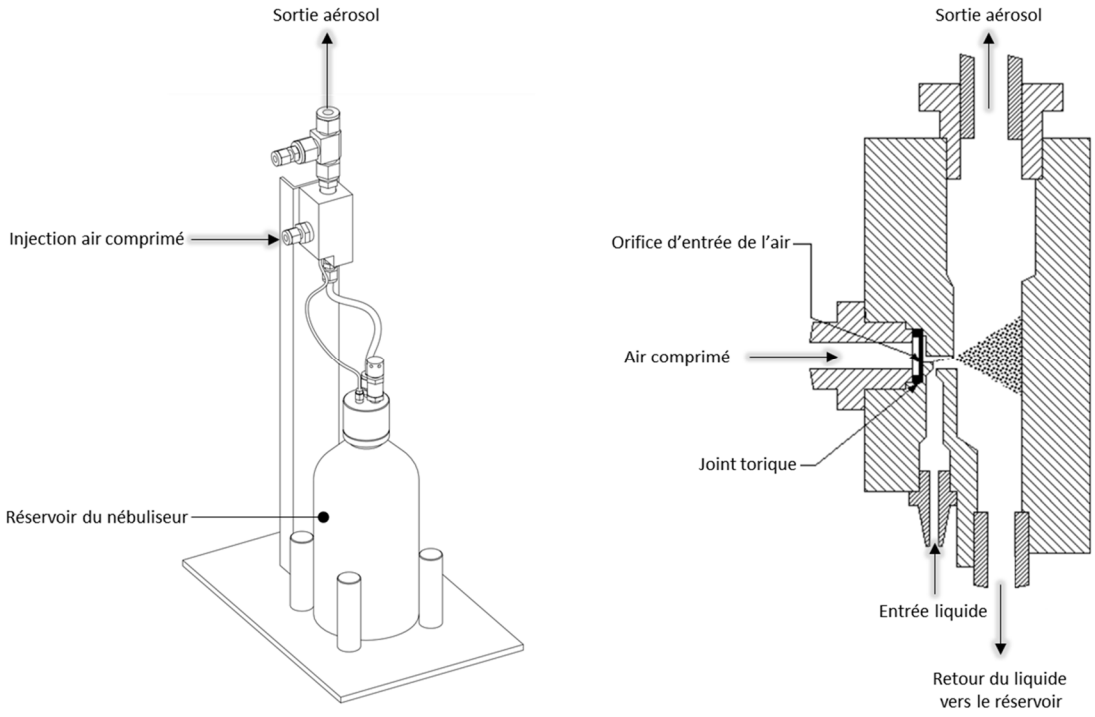


Figure 30. Principe de fonctionnement du nébuliseur à jet 3076 TSI. Schéma adapté du manuel constructeur[19]. La granulométrie des particules produites repose sur la pression utilisée, les caractéristiques du solvant, du gaz porteur, la concentration et la dispersion des NM contenus dans le nébuliseur.

4.4. Séchage de l'aérosol

Deux sécheurs à diffusion ont été utilisés en série, afin d'obtenir une humidité relative stable dans l'enceinte d'exposition pendant au moins 5 heures de génération en continu. Les particules traversent premièrement une chambre de condensation où s'impactent les plus grosses gouttelettes, puis elles parviennent aux sécheurs remplis quotidiennement de gel de silice (régénérés à 100°C), afin d'avoir des capacités suffisantes d'absorption de l'humidité des particules. Cette forme de silice très polaire à la surface spécifique importante, s'hydrate extrêmement rapidement en provoquant l'assèchement progressif de l'aérosol, causant ainsi l'agglomération des particules présentes dans les gouttelettes d'eau et la cristallisation des sels (Figure 31).

[19] https://tsi.com/categories-de-produits/generateurs-et-disperseurs-d'aerosols/generateurs-polydisperse/atomiseur-a-debit-constante-3076/

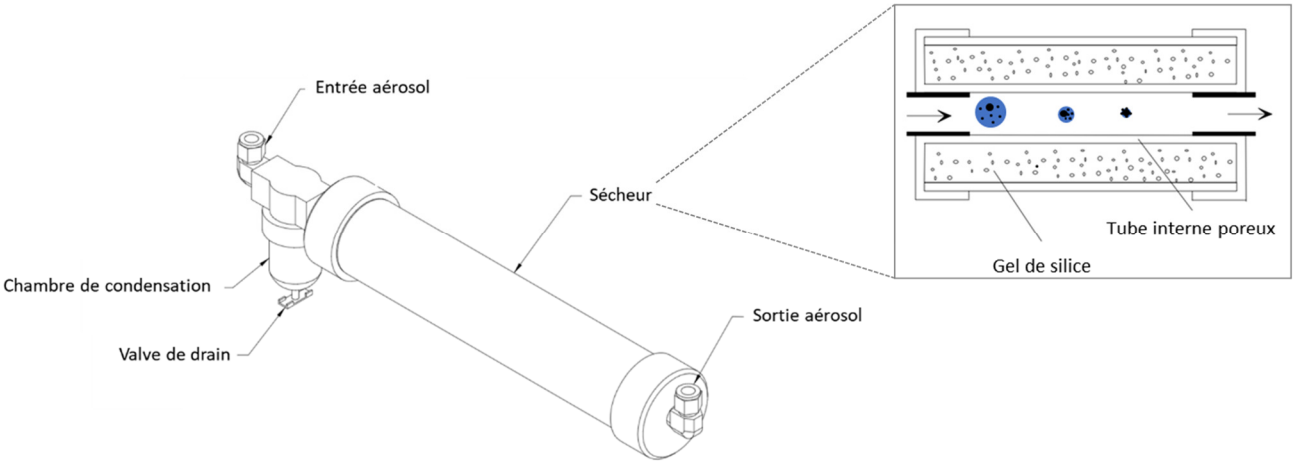


Figure 31. Principe de fonctionnement d'un sécheur à diffusion et illustration des phénomènes d'agglomération et d'agrégation consécutifs à l'évaporation progressive du solvant utilisé pour la génération d'aérosols par voie humide. Le gel de silice grâce à ses propriétés hygroscopiques permet une dessication rapide, menant à la formation de particules, initialement dispersées dans les gouttelettes du solvant. Schéma adapté du manuel constructeur[20].

5. Instruments de caractérisation des aérosols

5.1. Distribution granulométrique en nombre

5.1.1. SMPS

Le SMPS associe un DMA (*Differential Mobility Analyzer*) permettant de sélectionner les particules en fonction de leur mobilité électrique, avec un CPC (*Condensation Particle Counter*) placé en aval pour dénombrer les particules sélectionnées dans une gamme de taille allant de quelques nm à ~ 1µm. Une particule se déplace dans un champ électrique selon sa mobilité électrique et une sélection des particules est possible en les faisant traverser une colonne (classificateur) dans laquelle est induit un champ électrique variable. La tension appliquée peut ainsi être modulée afin de sélectionner les particules ayant la même mobilité électrique, ce qui correspond donc à une gamme de taille particulaire précise (aérosol monodispersé). Ces particules sont ensuite prélevées par un système de comptage optique, un compteur de noyaux de condensation, déterminant leur concentration en nombre. Ce comptage est effectué par l'analyse de la lumière diffusée par les particules préalablement grossies artificiellement par condensation d'un solvant (butanol ou eau)(Figure 32).

[20] https://tsi.com/product-accessories/diffusion-dryer-3062/

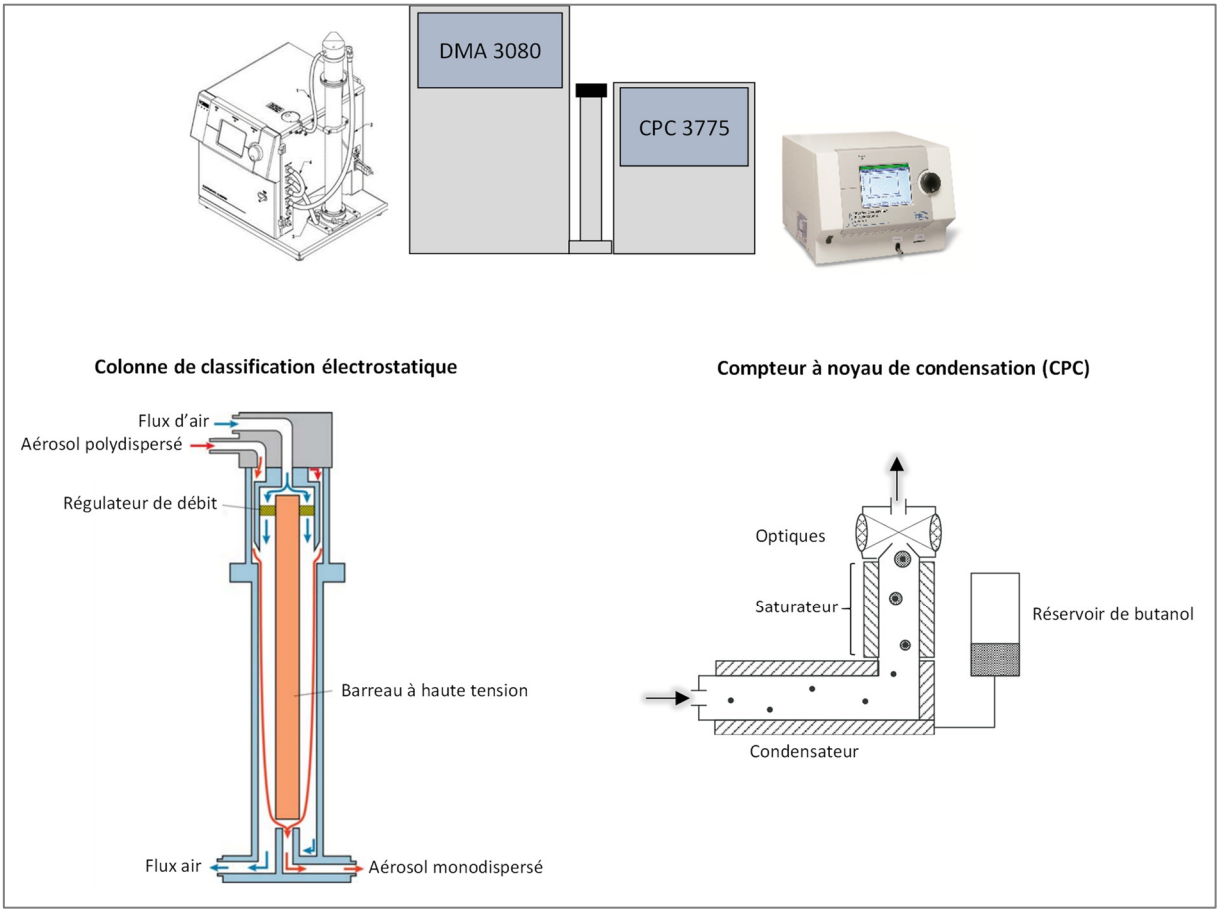


Figure 32. Principe de fonctionnement du SMPS, composé d'un DMA 3080 et d'un CPC 3775. Il permet l'analyse de la mobilité électrique des particules de diamètre submicronique. Une source radioactive (^{85}Kr) ou par rayons X est utilisée pour neutraliser l'aérosol afin d'imposer une charge électrique connue et uniforme aux particules. À l'aide d'une colonne de classification électrostatique, une mobilité électrique précise est ensuite sélectionnée, puis les particules sont dénombrées à l'aide d'un compteur optique à noyau de condensation. Adapté du manuel constructeur[21] et de l'infographie de (Mark Crooks, 2017)

5.1.2. APS

L'APS (*Aerodynamic Particle Sizer*) permet de mesurer la granulométrie des aérosols en termes de diamètre aérodynamique, allant de 0,6 µm à 20 µm. Il fonctionne en accélérant les particules à travers un orifice de faible diamètre. En fonction de leurs caractéristiques, les particules ont une inertie différente qui induit une vitesse d'ajustement plus ou moins longue par rapport à celle de l'air. Ce retard à l'ajustement dépend du diamètre aérodynamique des particules, ce qui peut être déterminé en mesurant la vitesse particulaire à l'aide d'un faisceau laser divisé en deux. En passant au travers de ces faisceaux, les particules produisent deux impulsions lumineuses (Figure 33). Le temps entre ces deux impulsions, appelé « temps de vol », permet de déterminer leur diamètre aérodynamique (Notice APS TSI, 2004).

[21] http://cires1.colorado.edu/jimenez-group/Manuals/SMPS_3080_manual.pdf

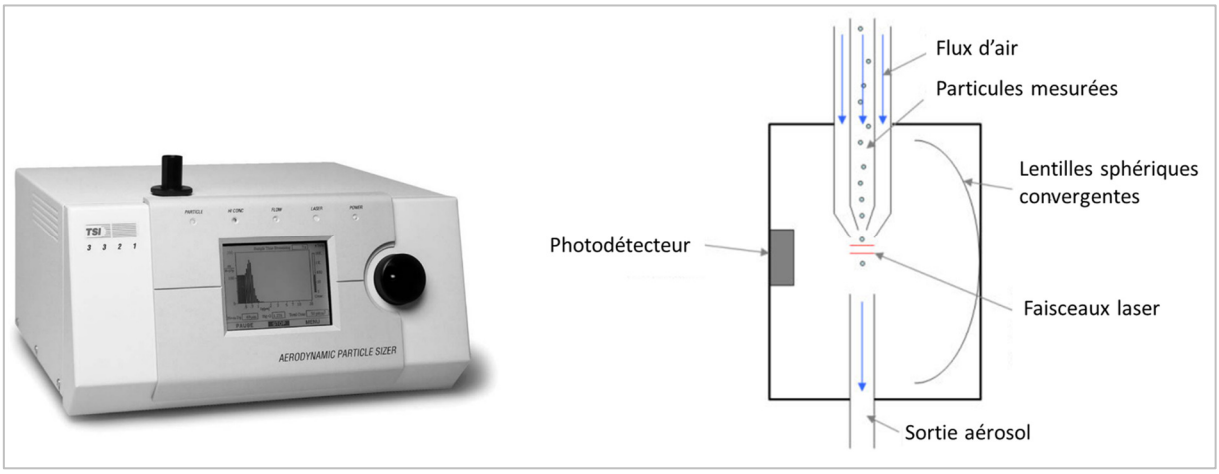


Figure 33. APS (*Aerodynamic Particle Sizer*) utilisé pour déterminer le diamètre aérodynamique des particules micrométriques. L'APS mesure la vitesse des particules au travers de deux faisceaux laser séparés d'environ 200 microns. Un système de lentilles recueille la lumière diffusée sur un photodétecteur. Une particule traversant les deux faisceaux produit deux impulsions de lumière diffusée, le délai entre les impulsions est lié à sa vitesse et à son diamètre aérodynamique. L'APS enregistre également la hauteur des pics permettant un calcul secondaire de la taille des particules basé sur la diffusion optique. Photographie issue du site du constructeur (TSI.com) et schéma adapté de l'infographie réalisée par l'université de Manchester[22].

5.2. Mesures gravimétriques

5.2.1. Mesures gravimétriques en temps réel : le TEOM

Le TEOM 50°C (modèle 1400, Ruppecht & Patashnick Co., Inc.) est un instrument de référence permettant la mesure en temps réel de la concentration massique des particules (Figure 34). L'aérosol est prélevé sur un filtre en fibre de verre qui suit un mouvement oscillatoire à haute fréquence. Les particules déposées vont modifier la masse du filtre ce qui fait varier sa fréquence d'oscillation. La température de fonctionnement de l'enceinte du filtre est maintenue à 50°C afin d'éviter la condensation de la vapeur d'eau qui pourrait interférer avec la mesure.

[22] http://www.cas.manchester.ac.uk/restools/instruments/aerosol/aps/

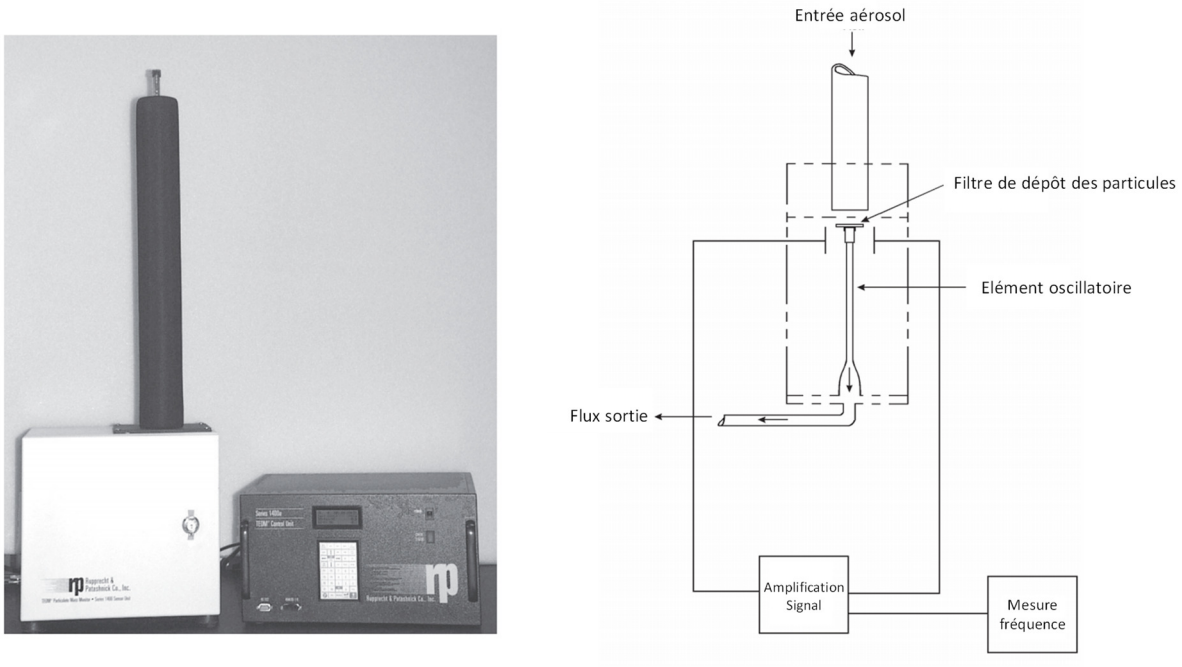


Figure 34. Principe de fonctionnement du TEOM. Adapté du manuel du fournisseur[23]

5.2.2. Mesure gravimétrique indirecte : le porte-filtre

Un porte-filtre et des filtres en microfibres de verre borosilicaté et polytétrafluoroéthylène (PALLFLEX, 47 mm) ont été utilisés au sein du dispositif d'exposition. Étant donné que le TEOM ne peut être utilisé en animalerie au long terme, il constitue une méthode de mesure gravimétrique indirecte pouvant être utilisée lors des expositions des animaux afin de caractériser la concentration massique moyenne dans la chambre d'exposition. Pour ce faire, les filtres sont pesés avant et après la génération des aérosols pour calculer la masse de particules déposées. Une condensation de l'eau contenue dans l'aérosol peut avoir lieu sur ce type de filtre, ce qui peut constituer un biais expérimental associé à la masse déposée. Cependant, la cohérence des mesures entre les relevés du TEOM et les relevés gravimétriques sur filtres a été évaluée dans le cadre de résultats préliminaires, issus de la génération d'aérosols de $nTiO_2$ pendant deux heures. Un écart relatif de seulement ± 3% a été obtenu entre les concentrations massiques mesurées au TEOM et celles mesurées grâce au porte-filtre.

5.3. Concentration en nombre

Le CPC 3007 (TSI®) est un compteur de noyaux de condensation portable, dont la compacité et la légèreté autorisent une utilisation directement sur le terrain. Il permet de mesurer en temps réel la

[23] http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/EPM-TEOM1405-Manual.pdf

concentration particulaire en nombre dans une large gamme de taille (10 nm – 1000 nm) et de concentration (de 1 à 10^5 particule/cm³). Ce compteur à noyau de condensation fonctionne sur le même principe que le CPC 3775, à la différence qu'il utilise la vapeur d'isopropanol. Cet instrument de mesure a été utilisé à la fois pendant la phase de caractérisation métrologique et pendant les expositions des animaux, afin d'assurer un suivi métrologique du bon fonctionnement de la génération des aérosols en temps réel à chaque étape du protocole (Figure 35).

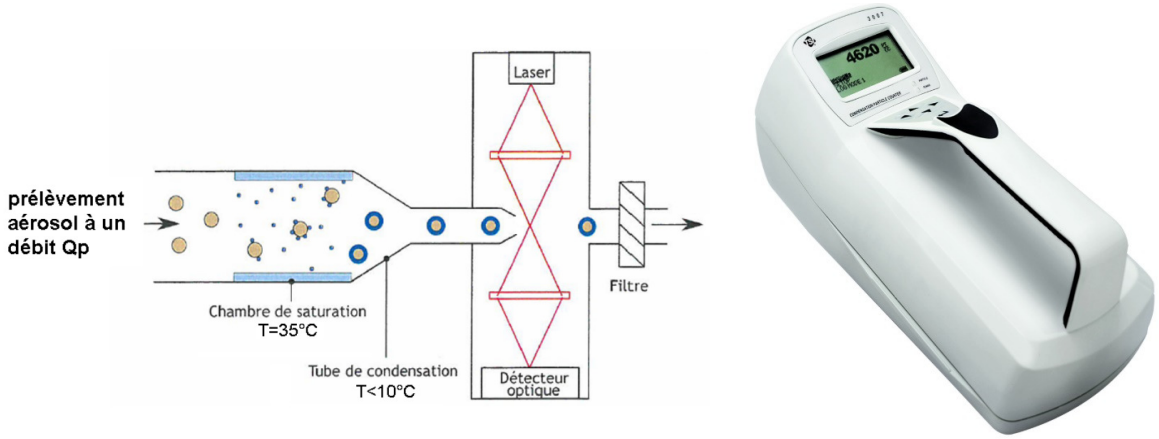


Figure 35. Présentation du CPC 3007 (TSI), compteur de particules portatif utilisé à la fois pendant la phase de caractérisation métrologique et pendant les expositions des animaux. Photographie issue du site du constructeur (TSI.com), schéma technique issue de (Bau et Witschger, 2009)[24].

5.4. Analyse morphologique et composition chimique élémentaire

5.4.1. Prélèvement des aérosols : Mini Particle Sampler® (MPS)

Les particules doivent être prélevées préalablement à leur observation en microscopie électronique. À cette fin, le système *Mini Particle Sampler* (MPS) a été développé par l'INERIS (R'mili et al., 2013) pour réaliser des prélèvements d'aérosol en utilisant des grilles de cuivre recouvertes d'un film de carbone (Quantifoil 1.2/1.3 TEM grid, Agar Scientific) sur lesquelles se déposent les particules avec une efficacité de filtration dépendante de leur taille. Les grilles présentent des cavités de diamètres variables (environ 1,2 µm) permettant la circulation de l'aérosol (Figure 36). Cela permet donc de collecter directement les particules sans préparation préalable sur une grille d'observation en MEB. Ainsi, l'efficacité de collecte des grilles pour des particules comprises entre 5 et 500 nm varie de 15% à 90% (R'mili et al., 2013).

[24] https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01547792/document

Une pompe à vide couplée à un régulateur de débit massique a été utilisée pour prélever à un débit de 0,3 L/min les aérosols d'intérêt sur la connexion dédiée au CPC 3007, pendant 5, 20 et 60 secondes pour les aérosols de TiO_2 et de PQ + $nTiO_2$, ou bien pendant 60, 150, 300 et 600 secondes pour l'aérosol de PQ, pour pallier une efficacité d'échantillonnage plus faible en lien avec sa distribution granulométrique.

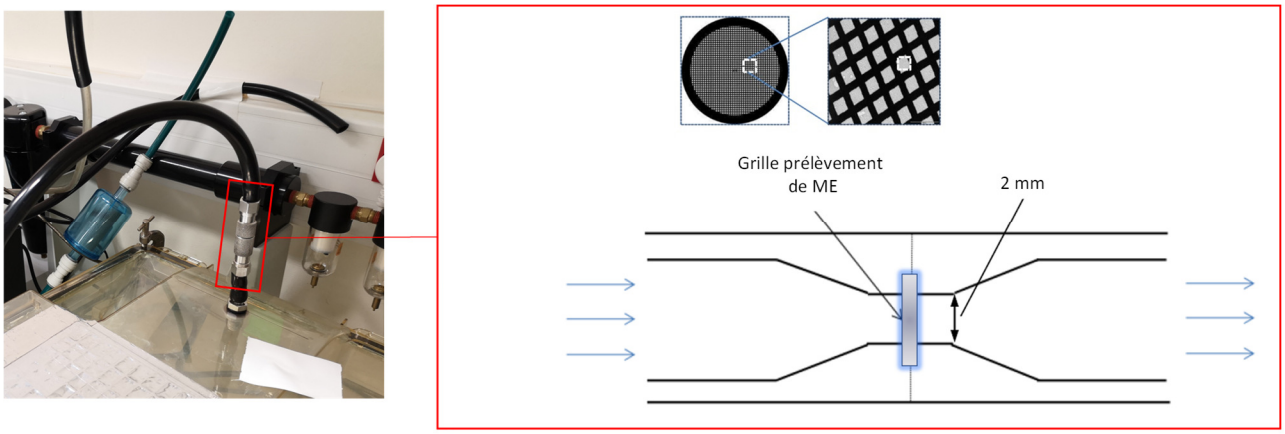


Figure 36. Photographie du dispositif et présentation du principe de fonctionnement du MPS utilisant une grille de microscopie électronique (ME) de cuivre couverte de carbone (Quantifoil 1.2/1.3 TEM grid, Agar Scientific), adapté de (R'Mili et al., 2013).

5.4.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à l'EDX (Energie Dispersive de rayons X)

La microscopie électronique repose sur l'interaction entre les électrons et l'échantillon analysé, qui est balayé par un faisceau électronique dont la longueur d'onde est de l'ordre de 10^{-10} m. Ce faisceau d'électrons est focalisé sur la surface de l'échantillon par un ensemble de lentilles magnétiques, entre lesquelles se trouve un système de balayage de la surface de l'échantillon dans une colonne placée sous vide. Ceci provoque l'éjection des électrons des couches électroniques de surface ce qui permet d'obtenir une signature élémentaire caractérisant l'échantillon (Figure 37). Les électrons issus de ces interactions électron-matière sont collectés par un détecteur pour être convertis en image. Les électrons rétrodiffusés permettent de mettre en évidence un relief ou une nature chimique spécifique, alors que la collecte des rayons X permet d'analyser la chimie de surface de l'échantillon. L'intensité du rayonnement X est comparée aux intensités des raies d'émission élémentaire afin d'établir sa composition.

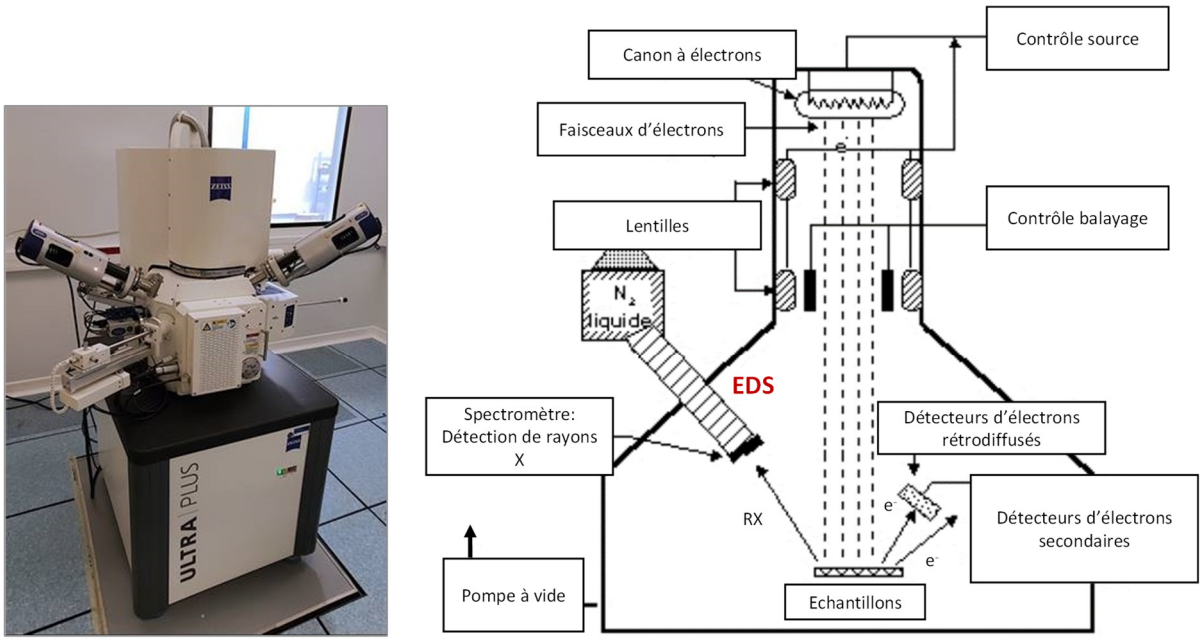


Figure 37. Présentation du MEB de la plateforme CARMEN (SEM Zeiss Ultra Plus, équipé de l'EDX Oxford UltimMax 65) et principe de fonctionnement de la MEB/EDX s'appuyant sur l'analyse de l'émission de rayons X et des électrons (rétrodiffusés et secondaires). Schéma adapté du travail doctoral de Sylvain Vigier [25].

6. Analyse de la stabilité du PQ en solution avec le $nTiO_2$

Afin d'estimer si une dégradation (photocatalytique, chimique…) induite par le $nTiO_2$ a lieu, la spectroscopie d'absorption UV-visible permet de suivre la concentration en PQ en solution aqueuse. La loi de Beer-Lambert peut être utilisée ($A = L \times \varepsilon \times c$), avec l'absorbance A d'un rayon monochromatique passant au travers d'une cuve en quartz de trajet optique L (1 cm), contenant l'analyte de concentration c (mol/L), ayant un coefficient d'extinction molaire ε (L/mol.cm). Cette technique simple permet de suivre la concentration du PQ au cours du temps dans le nébuliseur en présence de $nTiO_2$. Cantavenera et al. (2007) ont montré qu'un pic d'absorption à 257 nm caractérise ce composé (Figure 38). À mesure que le PQ est dégradé photocatalytiquement par le $nTiO_2$ sous illumination UV, il peut y avoir la formation de sous-produits modifiant le spectre d'absorbance entre 200 et 230 nm.

[25] https://www.theses.fr/137438796

Ainsi, la concentration en PQ initialement de 28 mg/L a été analysée à plusieurs temporalités (1 h, 2 h et 24 h) après avoir été mélangée en solution avec le $nTiO_2$ (3 g/L) dans le nébuliseur exposé à la lumière du laboratoire. Comme les particules de $nTiO_2$ provoquent une opacité totale, la suspension a d'abord été filtrée (Millex-GS Syringe Filter Unit, diamètre des pores : 0,22 µm) dans des cuves en quartz, pour être ensuite analysée grâce à un spectromètre (Perkin Elmer lambda 25 UV-VIS).

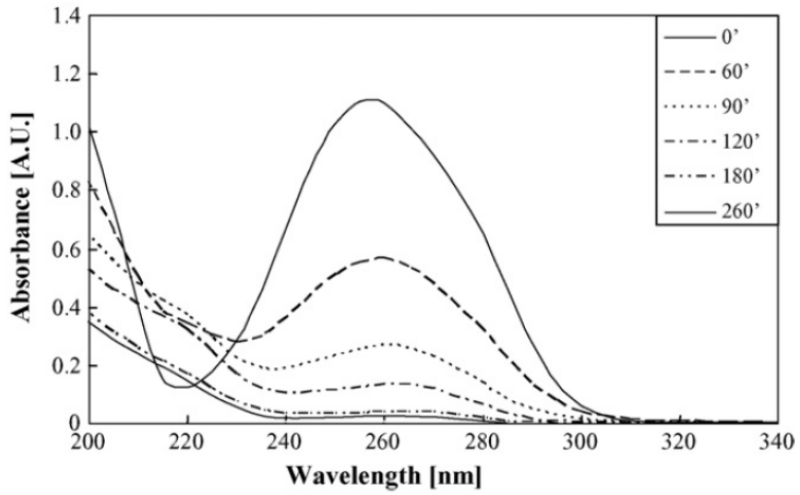


Figure 38. Cinétique de la dégradation du PQ (20 mg/L) par photocatalyse d'une suspension colloïdale contenant du P25 $nTiO_2$ (0,4 g/L), issue de l'article de Cantavenera et al. (2007)

7. Simulation numérique des concentrations particulaires : CFD (*Computational Fluid Dynamics*)

En collaboration avec le département Comportement au feu et sécurité incendie du LNE, une modélisation des mouvements particulaires a été réalisée pour évaluer l'homogénéité atmosphérique en simulant les concentrations particulaires dans l'enceinte d'exposition, sur la base des données issues de la caractérisation métrologique (débits, distribution en taille, écoulement…). L'intérêt de la CFD est de pouvoir prédire le comportement des particules dans un système dont la géométrie est connue. Ceci permet ensuite d'évaluer les performances d'un équipement et d'en optimiser les paramètres. Le logiciel COMSOL a été utilisé pour développer ce modèle. Les matériels et méthodes utilisés sont présentés dans l'article inclus dans la partie suivante.

VII. Caractérisation de la chambre d'exposition

Les résultats concernant la caractérisation de la chambre d'exposition aux aérosols sont présentés dans cette partie, sous la forme d'un article publié dans la revue *Aerosol and Air Quality Research* (https://doi.org/10.4209/aaqr.200626), intitulé : « *Metrological characterization of an aerosol exposure chamber to explore the inhalation effects of the combination of paraquat and TiO_2 nano-objects* ».

1. Résumé de l'article

Contexte

L'émergence des nanopesticides, qui incorporent des NM aux formulations conventionnelles des pesticides, posent des questions quant aux effets neurotoxiques de ces nouveaux produits susceptibles d'être inhalés après leur pulvérisation. À l'heure actuelle, aucune étude ne s'est penchée sur les effets toxicologiques de l'inhalation de telles substances. Afin de répondre à cette nouvelle question de recherche, le développement de modèles expérimentaux d'exposition par inhalation est nécessaire pour produire les données requises à l'évaluation du risque sanitaire associé à ces substances émergentes. Parmi les modèles d'exposition des rongeurs aux aérosols, deux méthodes prédominent, les chambres d'exposition « nez seul » et celles corps entier. Ces dernières possèdent l'avantage de permettre l'exposition des animaux en groupe, sans contention, de façon réaliste et modulable en fonction du protocole désiré. Elles se prêtent particulièrement bien aux expositions chroniques, aux faibles doses, impliquant des animaux supportant mal la contention, par exemple lors de la gestation. Ce type de chambre a été choisi pour développer une chambre d'exposition adaptée. Les principaux défis de la mise en place d'une chambre d'exposition reposent sur le respect du bien-être animal, la stabilité, l'homogénéité et la reproductibilité des aérosols générés qui doivent être caractérisés pour valider la reproductibilité de la procédure de génération des aérosols. Ainsi, cet article présente la caractérisation métrologique des paramètres de trois aérosols d'intérêt constitués de PQ, de $nTiO_2$ et d'un mélange de PQ + $nTiO_2$, mesurés dans une chambre d'exposition *ad hoc*.

Matériels et méthodes

Une cage d'animalerie commerciale dédiée à l'hébergement des rongeurs a été modifiée pour être associée avec un dispositif de génération d'aérosols utilisant un nébuliseur. Cette génération a été réalisée à partir de suspensions colloïdales de PQ et de $nTiO_2$ seul, ou en mélange, pour générer des concentrations de référence pour chacun des aérosols de PQ (0,1 mg/m³), de $nTiO_2$ (10 mg/m³) ou de

PQ + $nTiO_2$ (0,1 mg/m³ de PQ + 10 mg/m³ de $nTiO_2$). Afin d'analyser une possible dégradation du PQ sous l'action photocatalytique du $nTiO_2$, sa concentration a été suivie par spectroscopie dans le réservoir du nébuliseur dans nos conditions expérimentales. La caractérisation des aérosols a été réalisée au LNE grâce à des instruments de référence permettant le suivi des aérosols en temps réel dans la chambre d'exposition, en termes de distribution granulométrique en nombre, de concentrations particulaires totales en masse et en nombre, et des paramètres environnementaux (température, humidité, pression). Un dispositif de caractérisation métrologique complet ne peut être utilisé de façon permanente au sein d'une animalerie pour suivre la génération des aérosols au long cours. Par conséquent, les aérosols ont été caractérisés en amont du début d'une première campagne d'expositions, qui s'est alors déroulée avec un suivi métrologique allégé. Sur la base des caractéristiques des aérosols, une simulation de la mécanique des fluides numérique a été réalisée pour évaluer l'homogénéité des concentrations particulaires dans la chambre et la comparer avec les données obtenues expérimentalement. À la suite de cette première phase, une campagne d'exposition a été réalisée chez la souris afin de mettre les résultats en termes de concentrations en aérosols au regard de ceux obtenus lors de la caractérisation métrologique, afin de valider le fonctionnement sur le terrain du dispositif d'exposition proposé.

Résultats

Les différents paramètres mesurés lors de la caractérisation se sont avérés stables tout au long de la génération des aérosols, en termes de paramètres environnementaux, de distribution en taille, de concentrations massiques, de concentrations particulaires en nombre, et les écarts-types de reproductibilité associés à ces différents paramètres se sont situés entre 1 et 11%. Ceci est également en accord avec la première campagne d'exposition des animaux, ayant rapporté des concentrations particulaires en nombre, similaires à celles obtenues lors de la caractérisation en termes de valeurs obtenues et de dispersion des données mesurées. Nos résultats correspondent aux exigences associées aux dispositifs d'exposition corps entier utilisés dans le cadre réglementaire de l'évaluation toxicologique des aérosols, qui requiert une déviation de la moyenne des concentrations rapportées inférieures à 20% entre chacune des sessions d'exposition. Grâce à l'association entre la simulation numérique et les relevés dans la cage, la durée d'homogénéisation dans la chambre a été évaluée à environ 7 minutes après le lancement de la génération en termes de concentrations particulaires. Aucune différence n'a été observée entre les concentrations évaluées dans la zone respiratoire des animaux et le point de prélèvement des aérosols. En outre, aucune dégradation du PQ n'a été mesurée en suspension avec le $nTiO_2$.

Conclusions et perspectives

En conclusion, cette chambre d'exposition simple et facilement adaptable en animalerie, peut être utilisée pour la mise en place d'études toxicologiques impliquant plusieurs espèces de rongeurs. D'autres substances que celles présentées dans cet article peuvent être étudiées, en proposant une caractérisation minimale des aérosols d'exposition en amont (distribution en taille, concentrations massique et en nombre). Son fonctionnement peut être assuré sur le long terme en suivant la concentration des particules en nombre au sein de la chambre pour attester du bon fonctionnement de la génération des aérosols. L'homogénéité de l'atmosphère dans la chambre, associée à la caractérisation des aérosols, permettra l'évaluation précise des doses d'exposition reçues par les animaux, afin d'être en mesure d'estimer la fraction de dépôt des particules dans leurs voies aériennes. Ces données sont en effet essentielles à l'extrapolation des doses délivrées expérimentalement à une dose d'exposition chez l'être humain, afin de permettre l'évaluation du risque sanitaire associé aux substances étudiées, en lien avec les lignes directrices de l'OCDE et le contexte normatif visant à harmoniser les protocoles d'exposition. Ce dispositif caractérisé au laboratoire et validé sur le terrain, permettra donc la mise en place d'une étude chez la souris gestante, afin d'estimer l'existence d'effets cocktails potentiels induits par le mélange entre le PQ et le $nTiO_2$ sur le neurodéveloppement de leur progéniture.

2. Caractérisation métrologique d'une chambre d'exposition aux aérosols pour explorer les effets de l'inhalation d'un mélange de paraquat et de nano-objets de TiO_2

Metrological characterization of an aerosol exposure chamber to explore the inhalation effects of the combination of paraquat and TiO_2 nano-objects

Quentin Hamdaoui[1,3], Anna Bencsik[2], Frédéric Flamant[3], Simon Delcour[1] Tatiana Macé[1], Sophie Vaslin-Reimann[1], François Gaie-Levrel[1]

[1]*Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), Paris, France*

[2]*Université Claude Bernard Lyon 1, ANSES, laboratoire de Lyon, France*

[3]*IGFL, Functional genomics of thyroid hormone signaling group, Lyon, France*

Abstract

Agriculture is a main source of airborne contaminants and the perspective of a potential environmental release of a new type of pesticides - the nanopesticides - raises questions about the inhalation effects of these agrochemicals. These innovative products, whose inhalation effects are still not explored, encompass engineered nanomaterials (ENMs) used either directly as active substances, or mixed as ENMs additives within a pesticide formulation. If the adverse effects of pesticides are extensively studied, the potential toxic synergy involving ENMs and pesticides is rarely explored. To this end, toxicological models are essential to assess the health consequences of such aerosols. The present study reports the characterization of a new exposure chamber, which is dedicated to inhalation toxicology using rodents, in order to assess the effects of the combination of titanium dioxide nano-objects ($nTiO_2$) and paraquat (PQ). A dynamic whole-body chamber was developed in order to comply with animal welfare and the OECD guidelines for inhalation toxicology studies. The generated aerosols were first metrologically characterized in terms of mass and number concentration, size distribution and atmosphere homogeneity. The facility reproducibility and proper functioning were then evaluated during a preliminary campaign on the field. It allowed the validation of the animal exposure sessions consistency with the metrological characterization in terms of mass and number particle concentrations. Finally, we demonstrate the suitability of this new exposure chamber to explore aerosol inhalation effects on rodents.

Keywords: Aerosol; Inhalation Paraquat, TiO_2 nano-objects

INTRODUCTION

Epidemiological studies highlight converging evidence suggesting a link between the professional and residential exposures to specific pesticides and chronic illnesses such as neurodegenerative diseases and cancers (Inserm, 2013; Kim et al., 2017). Pesticides represent an occupational risk for farmers, pesticides applicators and manufacturers, but also for the general population who may be indirectly exposed to pesticides during their application or because of their persistence in the air (Lu et al., 2000; Coscollà et al., 2013; Brouwer et al., 2017; Mattei et al., 2019). Engineered nanomaterials (ENMs) are generally defined as novel materials designed at the nanoscale, with external or internal structures under the size of 100 nm (e.g., International Organization for Standardization: ISO/TR 18401:2017). ENMs could be used either as active ingredients or co-formulants, to provide nanopesticides (NPEs) proposing a reformulation of conventional pesticides. They are expected to enhance the efficiency of agrochemicals and to mitigate the environmental footprint of modern agriculture. Despite the lack of data on their current use, the number of granted patents associated with ENMs in agriculture grew significantly starting in the 1990s to reach 1,254 patents in 2016 (Kah et al., 2019). Moreover, some NPEs have already been identified on the market (Kumar et al., 2019), showing that those products are likely to emerge in a near future. As the fate of NPEs is still not understood, some authors have already emphasized the knowledge gap surrounding the environmental impact of these emerging products (Kah et al., 2018) and some research agencies have integrated these new compounds as a healthcare priority (USDA, 2015).

Several studies analyzed the presence of pesticides in the atmosphere (Coscollà et al., 2010; Estellano et al., 2015; López et al., 2017; Désert et al., 2018). Their air concentrations ranged from few picograms to hundreds of nanograms per cubic meter. Nevertheless, the air concentration of pesticides can be locally much higher in treated parcels during the seasonal spreading. For instance, a study with Paraquat (PQ) sprayers showed that the PQ mass concentration can reach 125 µg/m^3 in the breathing zone during work (Morshed et al., 2010). Another study assessed the size distribution of the pesticide residues in a French rural area (Coscollà et al., 2013). Most pesticides were accumulated in the particulate phase, especially in the fine size range (0.1 - 1 µm), which represent an inhalable fraction, whose size distribution enables particles to be deposited in the respiratory tract. Accordingly, inhalation toxicology studies appear necessary to assess the risk associated with NPEs exposure. However, to our knowledge no toxicological data are available on NPEs inhalation effects, involving both nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAAs), and pesticides.

A validation of the inhalation facility with characterized aerosol parameters is needed to conduct animal inhalation studies that will provide toxicity data for the risk assessment of nanopesticides. Among the variety of inhalation devices used for animal experimentation, there are two main exposure modalities, namely nose-only and whole-body devices (OECD TG 403; Yeh et al., 1990). The nose-

only strategy facilitates the control of the exposure dose for each animal. Animals are not able to move during the aerosol exposure, as they are restrained in a tube to be exposed individually by limiting other routes of exposure, such as the dermal and oral routes (Dorato and Wolff, 1991). However, the stress induced by restraint during gestation could be problematic, notably in case of repeated exposures. By contrast, in whole-body devices, subjects are immersed within the chamber atmosphere, which reflects environmental or occupational exposure scenarios, which are less restraining for animals since they are able to behave naturally. Whole-body exposure chambers encompass various types of chambers, using single animal holders or large-sized compartments for long-term studies using numerous subjects (Wong, 2007). They are particularly suitable for chronic studies or exposure during the gestation to minimize the stress induced by treatments. It must be noted that animals may be exposed by skin, as they collect particles on their fur during the whole-body exposures (Griffis et al., 1979), which can lead to the particle ingestion during grooming. Nevertheless, as inhalation and dermal routes are considered as the main occupational exposure pathways to pesticides (Damalas and Eleftherohorinos, 2011), this additional source of exposure could be relevant to consider.

To comply with the OECD test guidelines 413 on subchronic inhalation toxicity (OECD TG 413), the physicochemical characterization of ENMs is necessary prior to the aerosol exposures. Currently, Aeroxide® TiO_2 P25 nanopowder ($nTiO_2$) is one of the most studied ENMs in toxicology and it has already been characterized in a previous study in terms of crystalline structure, size of primary particles, specific surface area and chemical composition (Motzkus et al., 2014). Additionally, $nTiO_2$ appears as a good candidate to be integrated as a nano-additive in NPEs for its valuable properties in agriculture (Wang et al., 2016), such as its photocatalytic activity, which can be used to degrade PQ (Florêncio et al., 2004). PQ is one of the most worldwide used herbicide, despite the fact it is suspected to be associated with the occurrence of Parkinson disease among farmers (Kamel et al., 2007; Costello et al., 2009; Tanner Caroline M. et al., 2011). PQ and $nTiO_2$ under the form of a colloidal suspension may constitute a model of NPE with interesting features based on the technological inputs brought by $nTiO_2$ in agriculture and its ability to decrease the environmental PQ half-life in soils which could reach several years (Sartori and Vidrio, 2018).

Given the fact that the nanopesticide inhalation effects are still not addressed in the literature, the present study is the first necessary step to establish a proof of concept of a transdisciplinary methodology combining aerosol metrology and toxicology to address properly this question. The present paper is dedicated to the metrological characterization of an aerosol exposure chamber to explore the inhalation effects of the herbicide PQ combined with $nTiO_2$ used as reference materials. The second step consisting in the neurotoxicological assessment of these aerosols, will be addressed separately in upcoming dedicated articles. Thus, a new whole-body exposure chamber was developed to explore the inhalation effects of aerosols. It is a simple device which can fit easily in any animal facility to be operated safely by conforming with animal welfare. As a complete metrological set-up cannot be implemented

permanently in an animal facility for long term studies, the characterization had to be made prior to the animal exposure. The characterization was made in the LNE laboratory, in terms of size distribution (SMPS + APS), mass concentration (TEOM + indirect measurements of the sampled mass on 47-mm filters), number concentration (CPC), temperature, pressure and relative humidity. In addition, based on the particle size distribution, the chamber geometry and the airflows, a Computational Fluid Dynamics (CFD) modelling was used to investigate the homogeneity of the particle concentration within the cage. The main goal for the CFD simulation was to investigate the fill-up process of the chamber, the possibility of error induced by the relative positions of the injection tube and the measurement sampling tube. These parameters were assessed in accordance with the standard method on the reproducibility measurement (ISO 5725-2:2020).

Because it seems essential to validate the functioning of the characterized aerosol exposure chamber on the field, here we also report the comparison of the measurements made in the LNE metrological lab (without animal) in regard to the first preliminary data obtained in the animal facility (with animals) for each of the three aerosols. During the animal exposure, a reduced monitoring of the aerosol was used to check the proper aerosol generation, to enable a precise metrological follow-up of the exposures. The mass concentration and the particle number concentration were therefore used to validate animal exposure sessions in accordance with the metrological characterization phase.

MATERIALS AND METHODS

Inhalation exposure chamber

The exposure chamber is composed of a rodent cage used as a whole-body exposure system (Fig. 1). The chamber was sealed and customized with antistatic silicon pipes to be integrated within the generation device. This cage, initially dedicated to rodents hosting (rats, mice, hamsters or others) in animal facilities, is made out of polysulfone (Tecniplast GR900, internal volume of 19.8 L, overall dimensions of 395×346×213 mm [W×D×H]). It was selected for the chemical resistance and the transparency of this material (Tuttle et al., 2010), which allowed a visual follow-up of animals during the exposure sessions. Coupled with this chamber, an aerosol nebulizer (model 3076, TSI Inc.) was operated to generate three aerosols of interest, i.e., $nTiO_2$, PQ and $nTiO_2$ with PQ produced from daily prepared colloidal suspensions and solutions with bulk powders of $nTiO_2$ (Sigma Aldrich reference 718467) and PQ dichloride hydrate (Sigma Aldrich France, reference 856177). All colloidal suspensions and solutions were prepared using ultrapure water (MilliQ, Millipore, 18.2 MΩ·cm resistivity) with $nTiO_2$ and PQ concentrations of 3 g/L and 28 mg/L respectively and were kept under constant stirring during the nebulization process using a magnetic stirrer. These concentrations were used in order to produce aerosols achieving the target concentrations. Concerning the $nTiO_2$ use in nanopesticides, it is not possible to know the precise mass concentration to which people could be exposed in link with

professional or residential exposures. Nevertheless, some authors investigated the mass concentrations of $nTiO_2$ in Korean production sites, thanks to personal sampling and real-time monitoring using SMPS (Lee et al., 2011). As a result, they highlighted that TiO_2 mass concentrations can reach 4.99 mg/m^3, involving a particle size range of 15 to 710.5 nm. In addition, to be comparable with other studies dealing with $nTiO_2$ inhalation that showed relevant toxicological endpoints using rodents (Bermudez et al., 2004; Disdier et al., 2017; Chézeau et al., 2019), a target concentration of 10 mg/m^3 was chosen.

Concerning PQ, the minimum lethal mass concentration in rats from a single 4-hour inhalation exposure was reported to be 0.6 - 1.4 mg/m^3 (McLean et al., 1985). Moreover, a three-week inhalation study in rats reported the lowest observed adverse effect level (LOAEL) of 100 $\mu g/m^3$, based on the histopathological changes in the upper respiratory tract (Grimshav et al., 1979). Thus, the target concentration of 100 $\mu g/m^3$ corresponding to the NIOSH occupational limit was chosen to avoid pain and distress. This concentration is also in line with the 125 $\mu g/m^3$ occupational exposure reported by Morshed et al. (2010). The mixture being composed of both $nTiO_2$ and PQ aerosols, its target concentration was assumed to be 10.1 mg/m^3. The doses were chosen to be both relevant doses and realistic to cause slight adverse effects in the lungs due to inflammation and oxidative stress, in order to investigate any potential synergy effects due to the mixture. Briefly, these concentrations can be extrapolated to human beings based on the aerosol characterization using the Multiple-Path Particle Dosimetry Model (MPPD software), and they are comparable with the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) recommendations for $nTiO_2$ and PQ. The target concentration choice was made to highlight any possible cocktail effects between $nTiO_2$ and PQ within a toxicology protocol involving chronic exposures.

The nebulizer (model 3076, TSI Inc.) produced stable particle concentrations using compressed air (Pujalté et al., 2017b). It was operated at 2.4 bar which supplied a constant flowrate of 3.2 L/min. The compressed air was supplied by a silent air compressor coupled with a filtration and drying device (model 3074B, TSI Inc.). The produced airflow enabled a controlled dilution of the generated aerosols entering the exposure chamber. It was also dedicated to the dilution of a Condensation Particle Counter (CPC) to prevent the instrument upper range (10^5 $part/cm^3$) to be exceeded. The instrument airflow was checked for each aerosol generation to adjust concentrations with the proper dilution factor. Two downstream diffusion dryers were used to obtain aerosols with a steady relative humidity during the assays. The aerosols were injected horizontally thanks to a four-branched input in the top of the chamber in order to optimize the dispersion of particles. APS, SMPS and TEOM, which were present only during the characterization phase, needed a total flowrate of 5.8 L/min. SMPS and TEOM airflows were not diluted while a dilution of the APS flowrate was set at 2.5 L/min. The sample outlet flowrate of the exposure chamber was therefore set at 7.8 L/min thanks to the global instrumental flowrate (5.8 L/min), the filter holder sampling (1.7 L/min) and the CPC (0.3 L/min). In absence of the instruments used for the metrological characterization phase, a 7.5 L/min flowrate was set for the filter-holder sampling line.

To comply with OECD TG 413 guidelines, temperature, pressure, relative humidity and airflows were monitored in the chamber as environmental parameters during the characterization.

Aerosol characterization and monitoring

To characterize particle number size distributions (PNSD), mass and number concentration, a multi-instrumental setup composed of a real-time monitoring and off-line aerosol samplings was used (Fig. 1, part surrounded by a red dotted line). PNSD of submicronic aerosols were measured thanks to a scanning mobility particle sizer (SMPS, TSI Inc.) composed of a differential mobility analyzer (DMA model 3081, TSI Inc.) and a CPC (model 3775, TSI Inc.). An aerodynamic particle sizer (APS model 3321, TSI Inc.) monitored the 0.6 - 20 µm particle size range. At the top of the exposure chamber, a CPC (model 3007, TSI Inc.) was set up to measure the total particle number concentrations in real-time during the metrological characterization and during the exposure sessions. Total mass concentrations were measured in real-time using a Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM 50°C, model 1400, Thermo Fisher Scientific Inc.) during the characterization, and a 47 mm filter-holder allowed a gravimetric monitoring of aerosols during the exposure phase. This latter gravimetric measurement was performed to assess the mass concentrations, by using the mass difference between pre- and post-sampling filters, to be compared with the real-time aerosol mass concentrations assessed with TEOM. The aerosol filtration was made by a filter-holder with 47-mm filters (Pallflex® filters, EmfabTMTX40HI20-WW type) made out of borosilicate glass microfibers reinforced with woven glass cloth and bonded with PTFE. The filter holder was used to enable a complementary indirect gravimetric measurement during the characterization phase as well as the exposure phase. Gaie-Levrel et al. (2018) reported the use of these filters, which filtration efficiency was measured to characterize the most penetrating particle size (MPPS). For the size range of 100 nm particles, the filtration efficiency was 99.97%. Consequently, the samples fraction of particles on 47-mm filters is representative of the total mass concentration. This filter-holder was also coupled with a downstream HEPA filter (High-Efficiency Particulate Absorbing) to prevent any potential particle release during the experiment. Filters may adsorb water, which would alter the quality of particle mass concentration assessment. Nevertheless, it was not shown in our experimental procedure since filters were compared with the reference values of mass concentrations measured with TEOM during the metrological characterization phase to check the consistency between both measurement techniques. In conclusion, the data obtained with TEOM versus filters showed a deviation inferior to 3%.

The TEOM mass concentration measurements were not possible to achieve on a daily basis during the exposures of animal. Therefore, thanks to the 47 mm filter-holder, the mass concentration was measured for each experiment, based on the mass difference between pre- and post-sampling filters. These concentrations were used to check the steady functioning of aerosol generation during animal

exposure, using as a reference the TEOM characterization data made in real time during the characterization.

For the metrological characterization, ten experiments of two hours were performed on five days without animals, in order to characterize each generated aerosol, i.e., PQ, $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$. To assess the reproducibility of the generation method, the relative reproducibility standard deviation (S_R) according to the ISO 5725-2 standard (ISO 5725-2:2020) was reported. Due to the containment requirements of the animal facility (biosafety levels 1, 2 and 3), all objects entering the building must be sterilized and only workers accredited in animal experimentation can use the facility. As a consequence, it was technically impossible to use all the metrology instruments *in situ* within the animal facility. Therefore, the characterization phase was performed prior to animal experimentation without animal, to use the average number and mass concentrations as tracking parameters to validate the proper aerosol generation during the animal exposure. The exposure campaign, in presence of mice, consisted in 11 exposures sessions of 1.5 hour for each aerosol, during which the mass and number concentrations were measured to assess the reproducibility of the aerosol generation procedure, in order to validate the operating device on the field.

Aerosol dispersion modeling

To study the atmosphere homogeneity in the exposure chamber, simulations of the aerosol dispersion were performed for PQ and $nTiO_2$ aerosols using COMSOL Multiphysics software (version 5.4). A computer aided design (CAD) model of the test chamber was built and imported in COMSOL. Using the symmetry of the device, half of the chamber was modelled in order to reduce computational time. A preliminary simulation was run to characterize the flow behavior inside the exposure chamber without particles. Reynolds number in the injection tube is evaluated around 1000, hence a laminar flow formulation of Navier-Stokes equations was used. As the exposure chamber is small, and the ambient temperature is maintained for the duration of the test, it can be assumed that Brownian diffusion will not play an important part in the dispersion of the particles inside the chamber. An order of magnitude computation using the AEROCALC spreadsheet based on Baron & Willeke (Willeke and Baron, 2001) shows that diffusion losses are expected to reach a maximum of 2%, given chamber dimensions, flow rate and ambient parameters. It must be noted that such a computation gives a general order of magnitude of the diffusion contribution, which can still be significant at small spatial scale and yield local non-uniformities. Similarly, the small size of the particles leads to negligible inertial effects. Hence, the dispersion analysis was conducted using a passive scalar method. Navier-Stokes equations are resolved on a tetrahedral unstructured mesh with dedicated boundary layers meshing. The mesh includes around 568 k elements, with an average element quality (skewness) of 0.67. Initial conditions are set with no velocity and no particles inside the chamber. At time point T = 0, the fluid flow is ramped up on three

seconds, with a target velocity of 0.64 m/s at both inlets using the experimental flow rate and an input concentration of 1000 particles/m^3. The outlet was set at a constant pressure difference of -60 Pa. The simulation was run for 900 seconds (15 CPUs, 32 GB RAM) of simulated time with a total computation time around 80 minutes.

Paraquat stability

Thanks to a spectrophotometer (Perkin Elmer lambda 25 UV-VIS spectrometer), suspensions of PQ with $nTiO_2$ were analyzed at different times, i.e., T = 0, 1, 2 and 24 h, to assess the possible photocatalytic degradations of PQ due to $nTiO_2$. For PQ, the absorbance peak was selected at 257 nm and by-products of degradations can be potentially observed in the 200 - 230 nm range (Cantavenera et al., 2007). For instrumental calibration, aqueous solutions of PQ with concentrations ranging from 6.25 to 40 mg/L were used. As $nTiO_2$ absorbs in the UV-visible wavelength, suspensions were filtered (Millex-GS Syringe Filter Unit, pore diameter: 0.22 µm) prior to analysis in order to prevent $nTiO_2$ aggregates to interfere with measurements.

RESULTS

Environmental parameters

Temperature (T°C) and relative humidity (RH) were monitored for two hours sessions within the exposure chamber during the characterization phase (Fig. S1, supplementary data). Average T°C and RH were characterized to be 24.5 ± 0.4°C and 20.1 ± 0.7% respectively with external laboratory conditions of 22.5 ± 1.2°C and 42.5 ± 7.8%. The difference in temperature was induced by the compressor operating temperature, which was comprised between 50 - 70°C, explaining the slight increase of temperature along the duration of nebulization, and the temperature difference with the lab conditions. At the outlet, a vacuum pump enabled a slight depression in the chamber (-60 ± 4 Pa) preventing the aerosol leakage in the laboratory. Based on the outlet airflow and the chamber volume, the air renewal was 22 volumes/h.

Particle number size distribution (PNSD)

Fig. 2A and 2B present the average PNSD measured in the exposure chamber during the characterization phase using SMPS and APS. They were unimodal and broadly ranged from 10 to 200 nm for PQ and from 15 to 2000 nm for $nTiO_2$ and PQ with $nTiO_2$. The count median mobility diameters (CMMD) were respectively 50 ± 1 nm, 220 ± 7 nm and 173 ± 2 nm for PQ, $nTiO_2$ and PQ with $nTiO_2$ aerosols respectively, with uncertainties corresponding to reproducibility standard deviation (S_R) in

agreement with ISO 5725-2 standard. Modal diameters for each aerosol were respectively: 56 ± 1 nm, 264 ± 15 nm and 191 ± 5 nm; mean diameters were respectively: 56 ± 1 nm, 264 ± 6 nm and 214 ± 2 nm. PNSD were stable for two hours of aerosol generation, as shown in Fig. 2C, which presents the average PNSD evolution over time for the PQ with $nTiO_2$ aerosol. PNSD reached an equilibrium state around 20 minutes (T_{20}) after the aerosol generation beginning and dropped at 120 min (T_{120}), which corresponds to the end of aerosol generation. The 0.8 – 20 µm particle size range was additionally monitored using APS (Fig. 2C). In this size range, no particles were detected for the aerosol of PQ.

Particle number concentration monitoring

The temporal evolution of the average particle number concentrations during both phases is presented in Fig. 3. The real-time monitoring is shown in Fig. 3A and 3B, while the evolution of the average concentrations for each aerosol generation is presented in Fig. 3C and 3D. The real-time measurements during the metrological characterization (Fig. 3A) showed that average concentrations were 258 × 10^3 particles/cm^3 ± 11%, 205 × 10^3 particles/cm^3 ± 10% and 292 × 10^3 particles/cm^3 ± 8% for PQ, $nTiO_2$ and PQ with $nTiO_2$ respectively. Comparatively, these concentrations were respectively 249 × 10^3 particles/cm^3 ± 7%, 202 × 10^3 particles/cm^3 ± 8% and 308 × 10^3 particles/cm^3 ± 9% during the animal exposure phase (Fig. 3B). The fact that particle number concentration in the mixture do not correspond to the sum of PQ and $nTiO_2$ number concentrations could be explained by an internal mixing between both components during the aerosol nebulization process. Number concentrations in both conditions reached a steady state between 5 and 10 minutes, they remained stable over time until the end of the aerosol generation. By taking the metrological characterization phase as reference, the real-time measurements during the first step of the animal exposure phase allowed the validation of the aerosol generation for each inhalation exposure. The results and their S_R are summarized in Table 1.

Total mass concentration

Fig. 4 presents the average mass concentrations measured by TEOM in the exposure chamber during the metrological characterization phase with their corresponding S_R. The total mass concentrations reached a steady state 10 min after the generation beginning for two hours of aerosol generation. For PQ, $nTiO_2$ and PQ with $nTiO_2$ they were respectively 98.7 ± 3.2 µg/m^3, 10.2 ± 0.9 mg/m^3 and 10.2 ± 0.4 mg/m^3. These values comply with the target concentrations of 100 µg/m^3 and 10 mg/m^3 for PQ, $nTiO_2$ and PQ with $nTiO_2$. Comparatively, during the exposure sessions, the average mass concentrations were 10.1 ± 0.4 mg/m^3 for $nTiO_2$ and 9.9 ± 0.8 mg/m^3 for PQ with $nTiO_2$.

Aerosol dispersion modeling

According to the PNSD values assessed during the prior characterization, no difference was observed by simulation in the particle dispersion between PQ and $nTiO_2$ (data not shown). Consequently, $nTiO_2$ aerosol was selected according to their characterized mean diameter (264 nm). Fig. 5A presents the chamber and its associated CAD model used for the simulation. Fig. 5B shows the particle number concentration simulation at T = 10 min and T = 15 min. At T = 10 min, the atmosphere was still heterogeneous, since the top area of the exposure chamber presented a slightly higher particle concentration, whereas a lower concentration was observable in the middle zone and at the bottom corner below the injection site. This atmosphere heterogeneity decreased over time and the atmosphere became mostly homogeneous at T = 15 min. Such a result is expected as the simulation was made using a passive scalar method (no diffusion, no inertia). As the characterization was made using aerosol sampling from the top of the chamber, the atmosphere homogeneity was assessed to check if the aerosol characterization reflected what animals were really breathing during exposures. To this end, the simulated number concentrations were specifically reported in the transverse plane the chamber floor (+1 cm) corresponding to the breathing area of mice. In addition, particle size distributions were compared using SMPS in both top and floor areas and no difference in the particles size distribution were visible between sampling points (data not shown) highlighting the aerosol spatial homogeneity of particles. Fig. 5C compared the simulated and the experimental average number concentrations in the chamber over time.

According to the guidelines for subchronic inhalation toxicology studies (OECD TG 413), T_{95} can be defined as the time required to reach 95% of the atmosphere steadiness in the exposure chamber. It was reached at T = 377 s by simulation and T = 428 s according to the experimental data, which highlighted the consistency between both datasets. In the exposure chamber, the breathing area of mice was in the range of 1 - 10 cm height, while the CPC measurement spot was located at the top of the chamber (20 cm height). To check if the sampling location could affect the particle concentrations, three transverse planes were defined inside the chamber at different heights (1 cm, 10 cm and 20 cm). Based on the simulated data, average number concentrations were calculated for each plane and T_{95} were respectively 382 s, 475 s, and 446 s (Fig. 5D). At 8 min, a plateau corresponding to the atmosphere steady-state was reached, showing the representativity of the aerosol sampling location at the top of the chamber compared to the mice breathing area at the bottom.

Paraquat stability

Regarding the stability of PQ + $nTiO_2$ suspension, no significant decrease of PQ concentration was detectable up to 24h after the solution preparation (Fig. S2 supplementary data). The concentration at

T_0, T_{120} and T_{24} hours were respectively 24.0 mg/L, 23.6 mg/L and 23.1 mg/L. This slight decrease correlated with an increase in the 200 - 230 nm range corresponding to byproducts formation (Cantavenera et al., 2007). PQ concentration was expected to decrease, by the $nTiO_2$ filtration process if adsorbed, which was not the case.

DISCUSSION

In this article, an experimental setup complying with OECD TG 413 guidelines, dedicated to inhalation toxicology studies with rodents is presented. The nanopesticide inhalation effects are still not addressed in the literature. Besides the novelty of this field of research, the insights of the article rely mainly in the fact that no whole-body chamber has already been used and characterized in this context. The cocktail effects associating nanomaterials and toxic substances have already been reported in numerous ecotoxicological studies, for instance as reviewed by Naasz et al. (2018), but not in toxicological studies. Thus, it seems essential to extend this novel topic of research to human health, by beginning to investigate the underlying mechanisms of toxicity, namely on the nervous system which is known to be a specific target of some nanosized toxics (Bencsik et al., 2018). Consequently, the protocol was established by generating inhalable particles whose size is characterized, in order to model the deposit fraction in the airways in upcoming article involving this device, to provide health data related to characterized exposures concentrations and conditions, for regulatory and toxicology purposes. In addition, nanopesticides represent a variety of different products, requiring a case by case toxic assessment depending on the conditions of use. The facility could be used to investigate other kind of nanosized substances, on the condition that a minimal characterization of aerosol is reported (size distribution, mass and number concentrations).

Stringent requirements are needed for chronic studies, like stated in the OECD TG 413 guidelines, as this facility is meant to be able to perform subchronic inhalation study lasting more than 30 days. The choice of a nebulizer reflects agricultural use of pesticides, which are typically sprayed using hydraulic nozzles (Hilz and Vermeer, 2013). The humidity control is essential to avoid the generation of too large aggregates and agglomerates, and to avoid the proliferation of microorganisms within the cage. In comparison to dry powder generation process, wet aerosol generation is more similar to sprayings. Two diffusion dryers were required to obtain a steady humidity for generations of two hours, by making a fast evaporation of the droplets before entering the exposure chamber. Nevertheless, this is indeed a model of generation and not an exact representation of the droplets size distribution generated with a hydraulic nozzle. In addition, some authors suggested that this type of nebulizer could represent a most versatile choice, suitable for inhalation toxicology studies (Schmoll et al., 2009; Pujalté et al., 2017b). The stability of the exposure conditions and the test atmosphere were characterized in order to comply with the OECD requirements for the testing of chemicals by inhalation. Environmental parameters

(exposure chamber airflows, temperature and relative humidity) and test atmosphere were characterized in terms of number size distribution, number and mass concentrations and spatio-temporal aerosol stability. To be consistent between both phases of this study, the animal exposure session includes a real-time concentration monitoring and a gravimetric sampling that are used in a complementary manner, in order to confirm the generation stability of aerosols. As a result, no significant difference was found between both phases. Between all aerosol generations, the chamber average concentrations did not deviate from the mean by more than ± 20%. Moreover, the time to reach the chamber equilibration (T_{95}) was around 7 min, which is short in comparison with the total duration of exposures. Three different aerosols were generated with a homogenous and unimodal number size distribution, characterized by a CMMD of 50 nm for PQ, 173 nm for $nTiO_2$ and 220 nm for PQ with $nTiO_2$, with respective geometric standard deviations (GSD) of 1.7, 2.1 and 2.2. The CMMD differences between the mixture and the compounds alone could be explained by the internal mixing between PQ and $nTiO_2$ during the aerosol nebulization process. This can be clearly observed on the corresponding size distribution which is a convolution of PQ and $nTiO_2$ size distributions. The reproducibility standard deviation (S_R) was comprised between 3 - 9% for mass concentrations and 7 - 11% for particle number concentrations. The size of primary $nTiO_2$ particles used in the study is 22 nm as previously described (Motzkus et al., 2014). However, the generation in the aerosol phase of individual primary particles is impossible due to high Van der Waals forces which do not allow dissociation of aggregates. Thus, the nebulization process enables a deagglomeration but not a disaggregation, explaining the mean size of 264 nm, as it was already previously discussed (Gaie-Levrel et al., 2020).

The characteristics comparison of existing exposure chambers may be inappropriate, because each system has its own requirements, depending on the protocol to achieve. The device presented in this article is in accordance with our expectations and the system was validated for our experimental conditions. It has general advantages, it is easy to transport, economical, compact, and thus adaptable to the constraints of animal facilities. It is also simple to operate and easily put in place, and it offers versatility to work with various rodent species (mice, rats, hamster or others). Moreover, the atmosphere homogeneity was assessed temporally and spatially, and both experimental and simulated data were consistent during the characterization and the exposures. These important features (mass concentration and size distribution) enabled a precise assessment of the exposure dose of animals, which is an essential requirement in chronic inhalation toxicology studies. Regarding the accuracy of data, our device compares advantageously to others. Cosnier et al., (2017) reported the generation of P25 $nTiO_2$ aerosols using a rotation brush generator coupled with a nose-only device. Based on the target mass concentration of 10 mg/m³, the calculated CMMD was 347 nm with a GSD of 2.29. The mean intra-experiment precision was comprised between 14% and 22% over six inhalation campaigns. Focusing on studies involving $nTiO_2$ nebulizers, Pujalté et al. (2017a) generated aerosols at a mass concentration of 15.57 mg/m³ (min-max: 9–21 mg/m³) using a 6-jet collision nebulizer with PNSD characterized by a GSD of

1.87 and a geometric mean diameter of 76.91 nm. Using also a six-jet collision nebulizer, Grassian et al. (2007) generated aerosols of $nTiO_2$ using a whole-body device for different exposures scenarios, which involved a subacute exposure (10 days, 4 h per day) at a mass concentration of 8.88 ± 1.98 mg/m^3 with PNSD characterized by a geometrical mean diameter of 128 nm (GSD of 1.7). Yi et al. (2013) used an innovative nebulizer to produce aerosol of $nTiO_2$ with PNSD characterized by a CMMD of 145 nm and a GSD of 2.3 in a 500 L whole-body inhalation exposure chamber. In their article, the atmosphere spatial homogeneity was assessed, by measuring the concentrations at different spots within the chamber, thereby showing a spatial maximum relative deviation from the mean concentration < 6%.

In this study, specific care was taken concerning animal welfare to reduce stress. This is a matter of prime importance, because a stress undergone during gestation is critical for the fetal development, and then prenatal stress can have long-term consequences for the offspring (Weinstock, 2005). Consequently, the maternal stress in rodents, possibly due to restraint of poor exposure chamber design, may exacerbate negative developmental effects (Rasco and Hood, 1995). In this regard, we selected a whole-body inhalation device to expose animals, as this cage allowed daily exposures with a direct visual follow-up without constraint. It also enables animals to move freely, which simulates a physical activity enhancing the pulmonary ventilation of mice to reflect more accurately occupational exposures. Glass and stainless steel are the classical material used in whole-body devices, because of their ability to age slowly compared to plastics (Dorato and Wolff, 1991). Some authors used stainless steel exposure chamber with a vertical injection flow (Kimmel et al., 1997) or a combination of vertical and horizontal flows input/output to reach a uniform aerosol concentration (Oldham et al., 2004). In our study, we chose a polysulfone cage dedicated to rodent hosting, because it is an inexpensive alternative, which is easy to accommodate in a rodent facility. It can be used to expose mice or other species continuously in chronic toxicity studies because this product is standard equipped to provide water and food. Moreover, it is easily washed and it can be used under a hood if necessary. A large number of animals can be exposed at the same time in a convenient way, which can significantly save time. Complications could arise from an important animal loading in the cage, which can increase the temperature, the relative humidity and the amount of air pollutants inside the chamber. Indeed, the ammonia coming from animal feces may be an issue since ammonia could affect animals and may also react with the test aerosols (Barrow and Steinhagen, 1982). According to Silver et al. (1946), the overall animal volume should not exceed 5% of the chamber volume to prevent this phenomenon (OECD TG 403). Therefore, we chose an important air renewal (22 volumes/h) and a low animal loading (<1% of chamber volume) to prevent particles and metabolites to be accumulated in our device. However, while air renewal within the cage is a key factor in the aerosol dispersion and homogenization, it must be limited to avoid a cold stress.

Some studies also took into consideration the environmental conditions associated with their exposure chambers (Kimmel and Kirk, 1997; Oldham et al., 2004; Jeon et al., 2002; Lucci et al., 2019), while other studies did not (Barrow and Steinhagen, 1982; Cheng et al., 1989; Phillpotts et al., 1997;

Bhaskar and Upadhyay, 2003; O'Shaughnessy et al., 2003;). It is indeed necessary to perform a deeper aerosol characterization, before following limited metrological endpoints during animal exposures. This characterization is primordial to enable an accurate assessment of the exposure concentration delivered to each animal. This assessment is based on the simulated deposited dose of particles in the lungs, which is a function of the aerosol mass concentration and size distribution. In addition, a homogeneous atmosphere is required, in order to minimize the variability of deposited dose between animals. For all these reasons, the minimum requirements are the mass and number concentrations, the size distribution, and also the environmental parameters assessments (temperature, air renewal, humidity and pressure), which are mandatory to get the experimentation authorization from the ethics committee. Moreover, it is important to note that only few studies validated their exposure chamber thanks to aerosol dispersion modeling (Kimmel et al., 1997; Oldham et al., 2004). The homogenization process results mainly from an adequate air renewal within the chamber, with proper inlet flows and chamber geometry (Kimmel et al., 1997). The analysis of the chamber structure and mass transfer forces such as diffusion is crucial to understand the test material distribution. Rajabi-Vardanjani et al., (2019) suggested that numerical simulation techniques should be used to predict flow velocity and aerosol dispersion in function of the chamber geometry in order to optimize an exposure chamber and the associated aerosol generation. Kimmel et al. (1997) found a clear agreement between assessment of chamber performance by CFD modelling and the analysis of performances by more conventional methods, which is in accordance with the results of this study. Nevertheless, their apparatus was much larger than in this work (700 L vs 19.8 L), which consequently required a more complete CFD modeling to be conducted. Cheng et al. (1989) and O'Shaughnessy et al. (2003) assumed that spatial and temporal uniformity were independent from each other in their whole-body exposure chambers. Oldham et al. did not make this assumption, taking in consideration the size of their chamber (20 L), which is relatively small in comparison with others, but similar to this work. The results we reported tended to conform with their statement. Uniformity assessment seemed not as good for whole-body chamber compared to those reported in nose-only exposure systems (Yeh et al., 1990; Cheng & Moss, 1995). However, it is consistent with the characterization reported for other large stationary whole-body exposure chambers (Schreck et al., 1981; MacFarland, 1983; Yeh et al., 1986; Cheng & Moss, 1995; O'Shaughnessy et al., 2003). The aerosol uniformity in several transverse planes (±5%) was judged acceptable, and since exposures occur with animal moving freely in the totality of the exposure chamber, the stability requirements are less stringent compared to nose-only devices. Nonetheless, variations may be caused by changes in small inward air leaks, mice movements and induced thermal convection, or other any unknown factors.

CONCLUSIONS

A whole-body inhalation device was set up and characterized to expose rodents to aerosols in the submicronic size range. This facility was designed to be simple and versatile to be part of various kinds of aerosol exposure protocols with various types of species. For exposures of two hours, this device was able to produce high, stable and reproducible amounts of particles in terms of mass/number concentration and particle size distribution. Indeed, the generated aerosols, composed either of PQ, $nTiO_2$ or the mixture of $nTiO_2$ and PQ, were first metrologically characterized in terms of mass/number concentrations and size distributions with a reproducibility standard deviation comprised between 1 and 11%. The validation exposure sessions to the studied aerosols were then characterized by a reproducibility standard deviation comprised between 4% and 9%, thus showing the consistency between both phases of the study. The characterization shows acceptable homogeneity of the chamber atmosphere in terms of aerosol concentrations, thereby enabling an accurate assessment of the exposure concentration delivered to each animal. This project will contribute to the production of toxicological data, which are required for the health risk assessment of emerging substances like NPEs.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper was carried out as part of a thesis supported by a CIFRE fellowship involving the collaboration of LNE and the École Normale Supérieure de Lyon (ENS de Lyon). We acknowledge the contribution of the SFR Biosciences animal facility (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL), especially the staff of the PBES for its precious help.

DISCLAIMER

The authors declare no conflict of interest.

FIGURES

Table 1. Mass and number concentrations measured during the metrological characterization phase and the animal exposure sessions.

	Average mass concentration [mg/m^{-3}]		**Average number concentration [× 10^3 particles/cm^{-3}]**	
Aerosol	Characterization	Animal exposure*	Characterization	Animal exposure
PQ	98.7 [10^{-3}] ± 3.2 (3%)	-	258 ± 29 (11%)	249 ± 17 (7%)
nTiO$_2$	10.2 ± 0.9 (9%)	10.1 ± 0.4 (4%)	205 ± 21 (10%)	202 ± 17 (8%)
PQ + nTiO$_2$	10.2 ± 0.4 (4%)	9.9 ± 0.8 (8%)	292 ± 22 (8%)	308 ± 27 (9%)

"-" Data not available; *Off-line gravimetric measurements
Results are presented as averages ± S_R with their corresponding relative S_R in brackets.

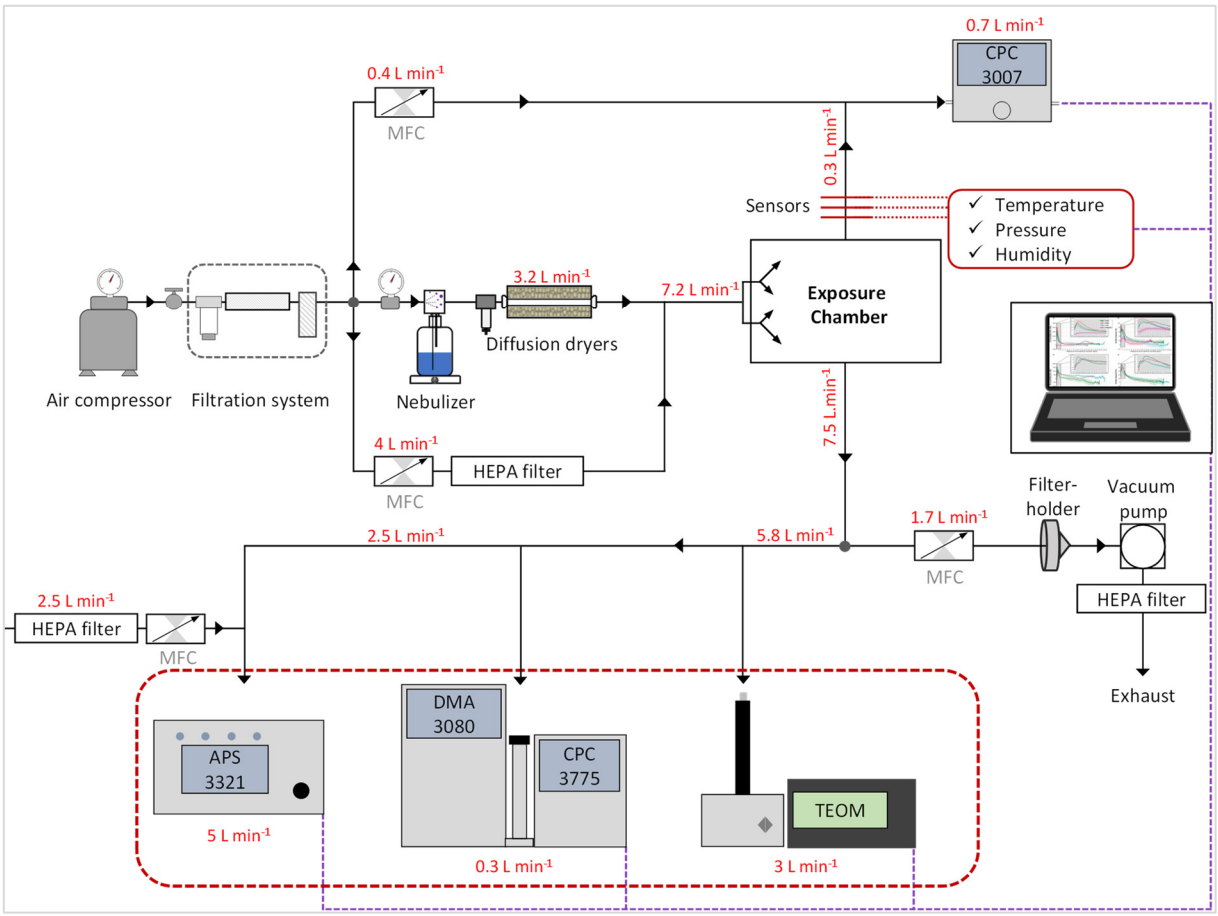


Figure 1. Experimental setup of the inhalation exposure chamber. The part surrounded by a red dotted line corresponds to the instruments used only for the metrological characterization phase; the different flowrates are presented in red; MFC: Mass flow controller.

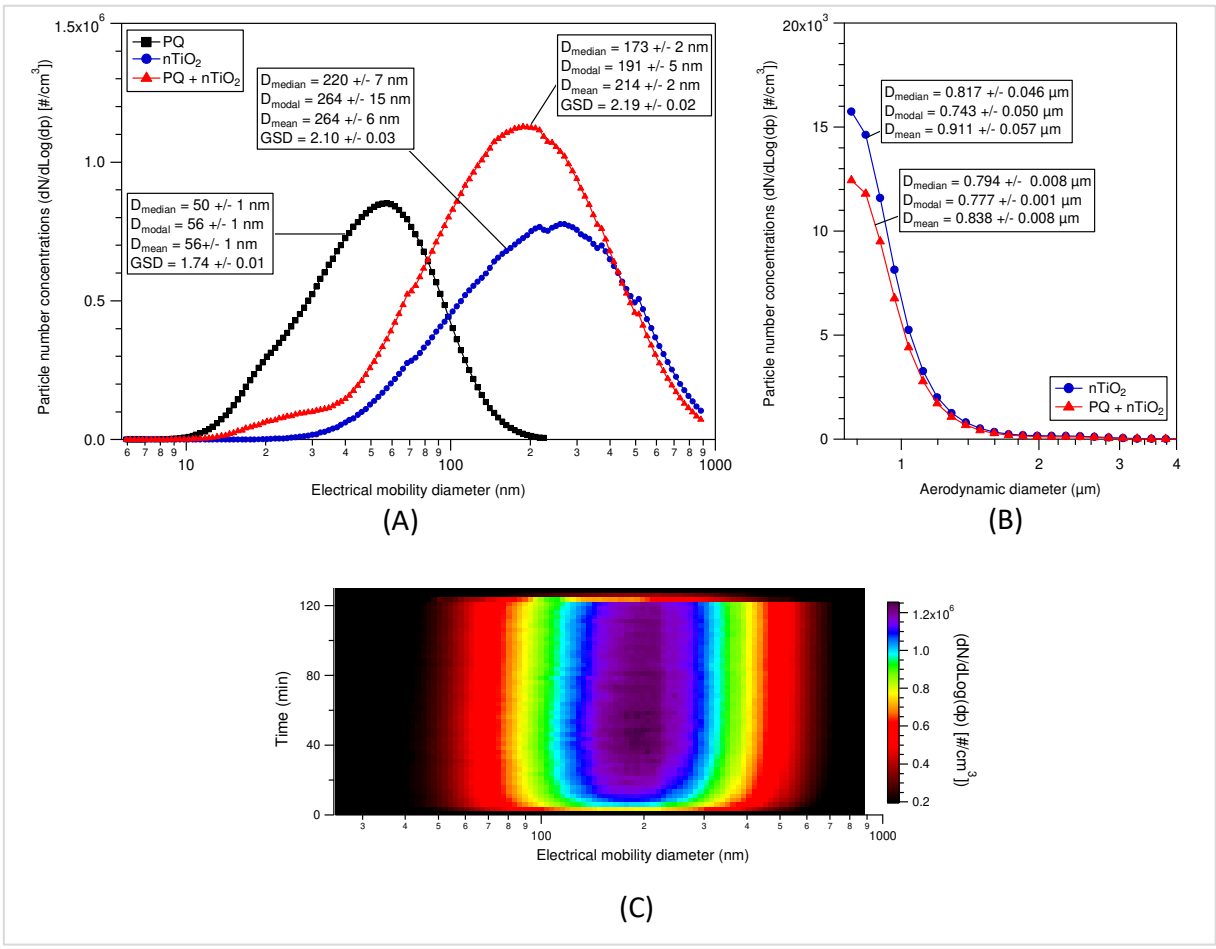


Figure 2. Average PNSD measured in the exposure chamber during the metrological characterization phase using SMPS (A) and APS (B) without animals, for each generated aerosol, i.e., PQ, $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$. PNSD temporal stability based on SMPS measurements for the PQ + $nTiO_2$ aerosol (C).

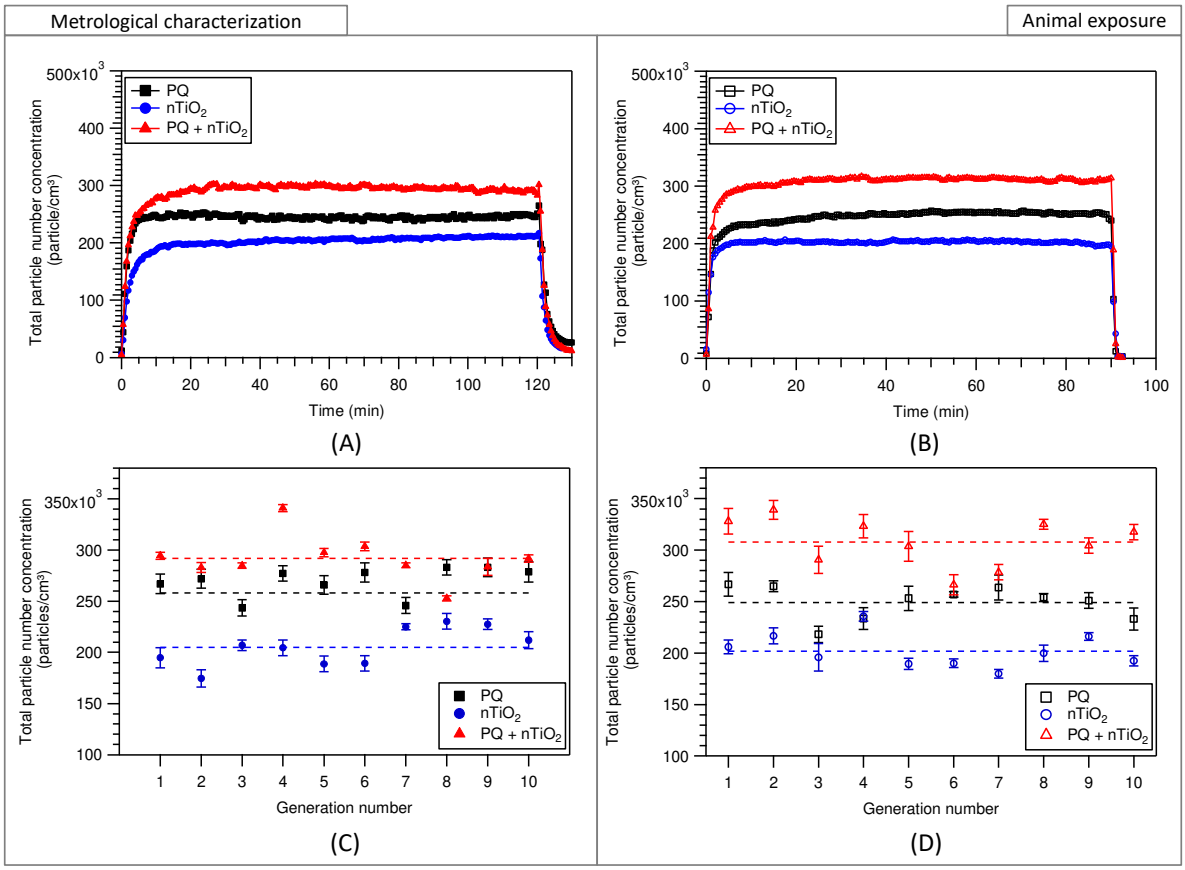


Figure 3. Particle number concentrations measured with CPC during the metrological characterization phase (A and C) and the animal exposure sessions (B and D). Mean results presented in function of time (A and B) or as individual aerosol generations ± standard deviation (C and D), the dotted line corresponding to the mean value for each aerosol.

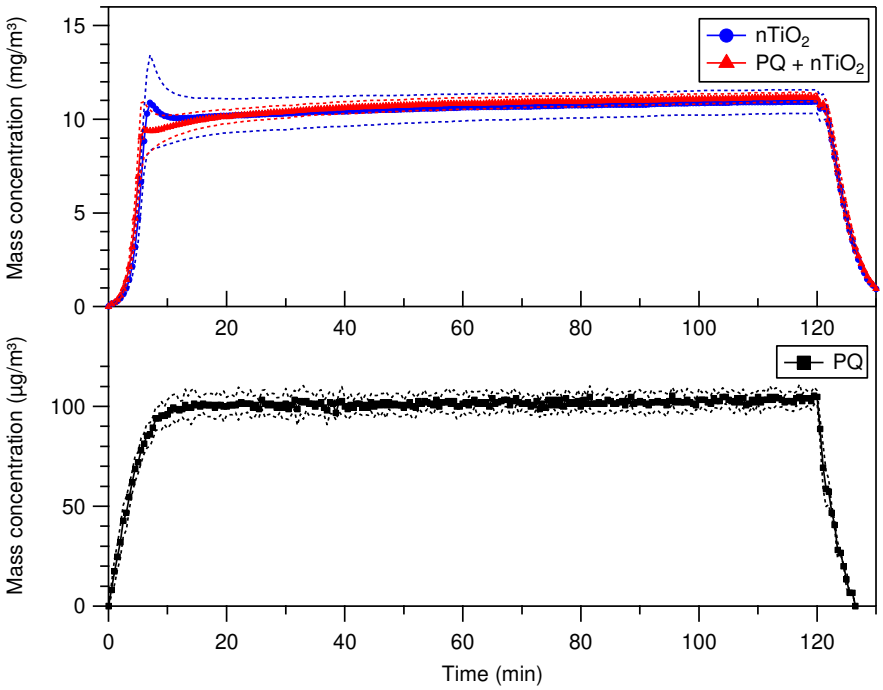


Figure 4. Average total mass concentration in the exposure chamber using TEOM for two hours of aerosol generation without animals. Results are presented as averages ± standard deviation (dotted lines) in function of time for $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$ (A), and PQ (B).

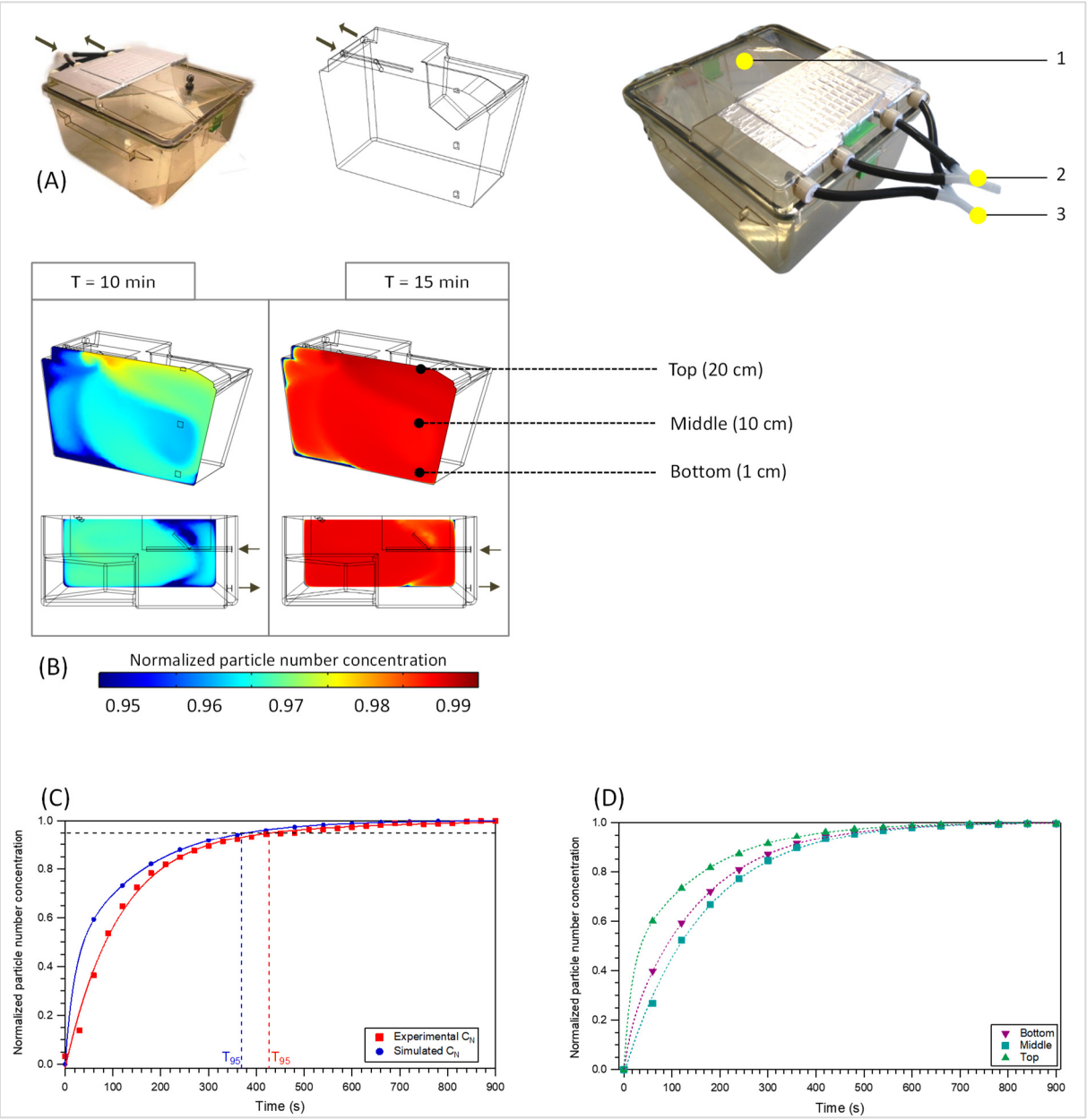


Figure 5. Chamber pictures and their associated CAD model used for simulation (A); 1: aerosol sampling point used for CPC measurements, 2: inlet, 3: outlet. Results of the particle number concentration simulation at 10 min and 15 min within the sagittal plane (at the top) and a transverse plane (at the bottom) that represent the chamber floor (+1 cm) corresponding to the breathing area of mice (B). Comparison of the Experimental and simulated normalized particle number concentrations within the exposure chamber (C). Normalized particle number concentrations assessed by simulation in planes located at different heights (D): 20 cm (top), 10 cm (middle) and 1 cm (bottom). T_{95}: needed time to reach 95% of the atmosphere equilibration in the chamber.

SUPPLEMENTARY DATA

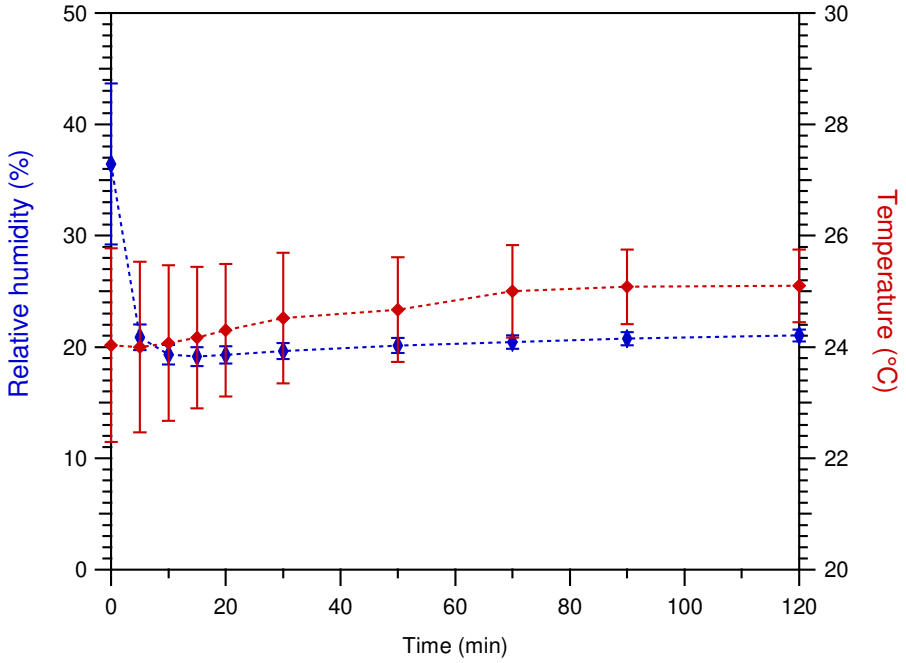


Figure S1. Average temperature and relative humidity measured in the exposure chamber during the characterization phase for aerosol generation of 2 hours without animals. Results presented as averages ± standard deviation.

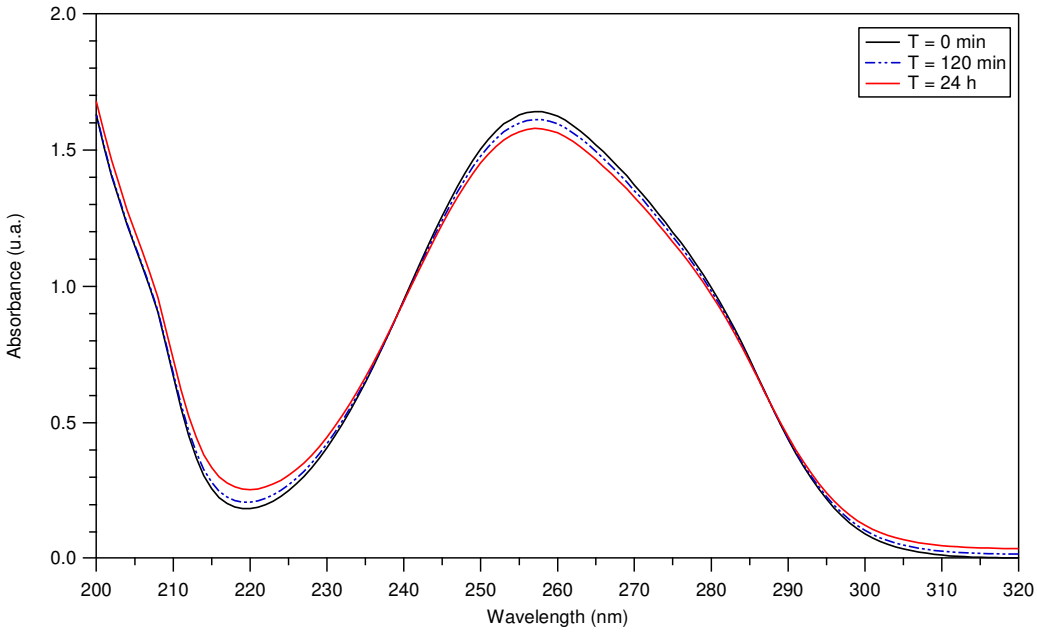


Figure S2. Absorption spectrum of PQ as a marker of stability in a $nTiO_2$ suspension at T0, T=120 min and T=24h. The absorption peak is at 257 nm and an increase in the 200 - 230 nm range corresponds to byproducts formation.

REFERENCES

Accuracy of Measurement Methods: ISO 5725-2:2020, https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/362ad6b6-2faf-42b5-8f67-9b200bf2977f/sist-iso-5725-2-2020, Accessed: 25 September 2020.

Bencsik, A., Lestaevel, P., Guseva Canu, I. (2018). Nano- and neurotoxicology: An emerging discipline. Prog. Neurobiol. 160, 45–63.

Barrow, C.S., Steinhagen, W.H. (1982). Design, construction and operation of a simple inhalation exposure system. Fundam. Appl. Toxicol. 2: 33–37.

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

Bhaskar, S., Upadhyay, P. (2003). Design and evaluation of an aerosol infection chamber for small animals. Int. J. Pharm. 255: 43–48.

Brouwer, M., Kromhout, H., Vermeulen, R., Duyzer, J., Kramer, H., Hazeu, G., de Snoo, G., Huss, A. (2018). Assessment of residential environmental exposure to pesticides from agricultural fields in the Netherlands. J Expo Sci Environ Epidemiol 28: 173–181.

Cantavenera, M.J., Catanzaro, I., Loddo, V., Palmisano, L., Sciandrello, G. (2007). Photocatalytic degradation of paraquat and genotoxicity of its intermediate products. J. Photochem. Photobiol. Chem. 185: 277–282.

Cheng, Y.-S., Barr, E.B., Carpenter, R.L., Benson, J.M., Hobbs, C.H. (1989). Improvement of Aerosol Distribution in Whole-Body Inhalation Exposure Chambers. Inhal. Toxicol. 1: 153–166.

Cheng, Y.-S., Moss, O.R. (1995). Inhalation Exposure Systems. Toxicol. Methods 5, 161–197.

Chézeau, L., Kohlstaedt, L.A., Faou, A.L., Cosnier, F., Rihn, B., Gaté, L. (2019). Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in rat exposed to TiO2 nanostructured aerosol by inhalation. J. Proteomics. 207: 103451.

Coscollà, C., Colin, P., Yahyaoui, A., Petrique, O., Yusà, V., Mellouki, A., Pastor, A. (2010). Occurrence of currently used pesticides in ambient air of Centre Region (France). Atmos. Environ. 44: 3915–3925.

Coscollà, C., Yahyaoui, A., Colin, P., Robin, C., Martinon, L., Val, S., Baeza-Squiban, A., Mellouki, A., Yusà, V. (2013). Particle size distributions of currently used pesticides in a rural atmosphere of France. Atmos. Environ. 81: 32–38.

Cosnier, F., Bau, S., Grossmann, S., Nunge, H., Brochard, C., Viton, S., Payet, R., Witschger, O., Gaté, L. (2017). Design and Characterization of an Inhalation System to Expose Rodents to Nanoaerosols. Aerosol Air Qual. Res. 16: 2989–3000.

Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., Zhang, X., Ritz, B. (2009). Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. Am. J. Epidemiol. 169: 919–926.

Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G. (2011). Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. Int. J. Environ. Res. Public. Health 8: 1402–1419.

Désert, M., Ravier, S., Gille, G., Quinapallo, A., Armengaud, A., Pochet, G., Savelli, J.-L., Wortham, H., Quivet, E. (2018). Spatial and temporal distribution of current-use pesticides in ambient air of Provence-Alpes-Côte-d'Azur Region and Corsica, France. Atmos. Environ. 192: 241–256.

Disdier, C., Chalansonnet, M., Gagnaire, F., Gaté, L., Cosnier, F., Devoy, J., Saba, W., Lund, A.K., Brun, E., Mabondzo, A. (2017). Brain Inflammation, Blood Brain Barrier dysfunction and Neuronal Synaptophysin Decrease after Inhalation Exposure to Titanium Dioxide Nano-aerosol in Aging Rats. Sci. Rep. 7: 1–13.

Dorato, M.A., Wolff, R.K. (1991). Inhalation exposure technology, dosimetry, and regulatory issues. Toxicol. Pathol. 19: 373–383.

Estellano, V.H., Pozo, Karla, Efstathiou, C., Pozo, Katerine, Corsolini, S., Focardi, S. (2015). Assessing levels and seasonal variations of current-use pesticides (CUPs) in the Tuscan atmosphere, Italy, using polyurethane foam disks (PUF) passive air samplers. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 205: 52–59.

Florêncio, M.H., Pires, E., Castro, A.L., Nunes, M.R., Borges, C., Costa, F.M. (2004). Photodegradation of Diquat and Paraquat in aqueous solutions by titanium dioxide: Evolution of degradation reactions and characterisation of intermediates. Chemosphere 55: 345–355.

Gaie-Levrel, F., Bau, S., Bregonzio-Rozier, L., Payet, R., Artous, S., Jacquinot, S., Guiot, A., Ouf, F.-X., Bourrous, S., Marpillat, A., Foulquier, C., Smith, G., Crenn, V., Feltin, N. (2020). An intercomparison exercise of good laboratory practices for nano-aerosol size measurements by mobility spectrometers. J. Nanoparticle Res. 22.

Gaie-Levrel, F., Bourrous, S., Macé, T. (2018). Development of a portable reference aerosol generator (PRAG) for calibration of particle mass concentration measurements. Particuology 37, 134–142.

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.

Griffis, L.C., Wolff, R.K., Beethe, R.L., Hobbs, C.H., McClellan, R.O. (1979). Pulmonary deposition of 99mTc labeled aerosol in a whole-body exposure. Inhalation Toxicology Research Institute annual report: 259-266.

Grimshav et al., P. (1979). Three-week inhalation study in rats exposed to an aerosol of paraquat (Repeat Study). Huntingdon Research Centre Report N°. ICI 279/79476 (CTL/C/810) Not GLP, Unpublished.

Hilz, E., Vermeer, A.W.P. (2013). Spray drift review: The extent to which a formulation can contribute to spray drift reduction. Crop Prot. 44: 75–83.

INSERM expertise collective : Pesticides Effets sur la santé (2013). https://www.inserm.fr/information-en-sante/expertises-collectives/pesticides-effets-sur-sante, Accessed: 20 September 2018.

Jeon, K., Yu, I.J., Ahn, K.-H. (2012). Evaluation of newly developed nose-only inhalation exposure chamber for nanoparticles. Inhal. Toxicol. 24, 550–556.

Kah, M., Kookana, R.S., Gogos, A., Bucheli, T.D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. Nat. Nanotechnol. 13: 677–684.

Kah, M., Tufenkji, N., White, J.C. (2019). Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. Nat. Nanotechnol. 14: 532–540.

Kamel, F., Tanner, C., Umbach, D., Hoppin, J., Alavanja, M., Blair, A., Comyns, K., Goldman, S., Korell, M., Langston, J., Ross, G., Sandler, D. (2007). Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. Am. J. Epidemiol. 165: 364–374.

Kim, K.-H., Kabir, E., Jahan, S.A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. Sci. Total Environ. 575: 525–535.

Kimmel, E.C., Yerkes, K.L., Carpenter, R.L. (1997). Performance, fluid mechanics, and design of a small-animal, whole-body inhalation exposure chamber. Inhal. Toxicol. 9: 287–316.

Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A.A., Kim, K.-H. (2019). Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. J. of Controlled Release 294: 131–153.

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

López, A., Yusà, V., Muñoz, A., Vera, T., Borràs, E., Ródenas, M., Coscollà, C. (2017). Risk assessment of airborne pesticides in a Mediterranean region of Spain. Sci. Total Environ. 574: 724–734.

Lu, C., Fenske, R.A., Simcox, N.J., Kalman, D. (2000). Pesticide exposure of children in an agricultural community: Evidence of household proximity to farmland and take home exposure pathways. Environ. Res. 84: 290–302.

Lucci, F., Tan, W.T., Krishnan, S., Hoeng, J., Vanscheeuwijck, P., Jaeger, R., Kuczaj, A. (2020). Experimental and computational investigation of a nose-only exposure chamber. Aerosol Sci. Technol. 54, 277–290.

MacFarland, H.N. (1983). Designs and operational characteristics of inhalation exposure equipment — A review. Fundam. Appl. Toxicol. 3, 603–613.

Mattei, C., Dupont, J., Wortham, H., Quivet, E. (2019). Influence of pesticide concentration on their heterogeneous atmospheric degradation by ozone. Chemosphere. 228: 75–82.

McLean, Marsh, J.R., Millward, S.W. (1985). Paraquat: 4 hour acute inhalation toxicity study in the rat. Unpublished study number CTL/P/1325 from ICI Central Toxicology Laboratory. Submitted to WHO by Syngenta.

Morshed, M.M., Omar, D., Mohamad, R., Wahed, S., Rahman, M.A. (2010). Airborne paraquat measurement and its exposure to spray operators in treated field environment. Int. J. Agric. Biol. 12: 679–684.

Motzkus, C., Gaie-Levrel, F., Ausset, P., Maillé, M., Baccile, N., Vaslin-Reimann, S., Idrac, J., Oster, D., Fischer, N., Macé, T. (2014). Impact of batch variability on physicochemical properties of manufactured TiO2 and SiO2 nanopowders. Powder Technol. 267: 39–53.

Naasz, S., Altenburger, R., Kühnel, D. (2018). Environmental mixtures of nanomaterials and chemicals: The Trojan-horse phenomenon and its relevance for ecotoxicity. Sci. Total Environ. 635, 1170–1181.

Nanotechnologies — Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series: ISO/TR 18401:2017, https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18401:ed-1:v1:en, Accessed: 28 October 2020

OECD (2009), Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris

OECD (2018), Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris

OECD (2018), Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris

Oldham, M.J., Phalen, R.F., Robinson, R.J., Kleinman, M.T. (2004). Performance of a Portable Whole-Body Mouse Exposure System. Inhal. Toxicol. 16: 657–662.

O'Shaughnessy, P.T., Achutan, C., O'Neill, M.E., Thorne, P.S. (2003). A small whole-body exposure chamber for laboratory use. Inhal. Toxicol. 15: 251–263.

Phillpotts, R.J., Brooks, T.J.G., Cox, C.S. (1997). A simple device for the exposure of animals to infectious microorganisms by the airborne route. Epidemiol. Infect. 118: 71–75.

Pujalté, I., Dieme, D., Haddad, S., Serventi, A.M., Bouchard, M. (2017a). Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles after inhalation in rats. Toxicol. Lett. 265: 77–85.

Pujalté, I., Serventi, A., Noël, A., Dieme, D., Haddad, S., Bouchard, M. (2017b). Characterization of Aerosols of Titanium Dioxide Nanoparticles Following Three Generation Methods Using an Optimized Aerosolization System Designed for Experimental Inhalation Studies. Toxics. 5(3):14.

Rajabi-Vardanjani, H., Asilian-Mahabadi, H., Sedehi, M. (2019). Particulate Matter Inhalation Exposure Chambers and Parameters Affecting Their Performance: A Systematic Review Study. Health Scope. 8(4):80163.

Rasco, J.F., Hood, R.D. (1995). Maternal restraint stress-enhanced teratogenicity of all-trans-retinoic acid in CD-1 mice. Teratology 51, 57–62.

Sartori, F., Vidrio, E. (2018). Environmental fate and ecotoxicology of paraquat: a California perspective. Toxicol. Environ. Chem. 100: 479–517.

Schmoll, L., Elzey, S., Grassian, V., O'Shaughnessy, P. (2009). Nanoparticle aerosol generation methods from bulk powders for inhalation exposure studies. Nanotoxicology 3: 265–275.

Schreck, R.M., Soderholm, S.C., Chan, T.L., Smiler, K.L., D'arcy, J.B. (1981). Experimental conditions in GMR chronic inhalation studies of diesel exhaust. J. Appl. Toxicol. 1, 67–76.

Silver, S.D., (1946). Constant flow gassing chambers: Principles influencing design and operation. J. Lab. Clin. Med. 31: 1153–1161.

Tanner Caroline M., Kamel Freya, Ross G. Webster, Hoppin Jane A., Goldman Samuel M., Korell Monica, Marras Connie, Bhudhikanok Grace S., Kasten Meike, Chade Anabel R., Comyns Kathleen, Richards Marie Barber, Meng Cheryl, Priestley Benjamin, Fernandez Hubert H., Cambi Franca, Umbach David M., Blair Aaron, Sandler Dale P., Langston J. William (2011). Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. Environ. Health Perspect. 119: 866–872.

Tuttle, R.S., Sosna, W.A., Daniels, D.E., Hamilton, S.B., Lednicky, J.A. (2010). Design, assembly, and validation of a nose-only inhalation exposure system for studies of aerosolized viable influenza H5N1 virus in ferrets. Virol. J. 7: 135.

United States Department of Agriculture, National Institute of Food and Agriculture (USDA, 2015). USDA announces $4.6 Million for Nanotechnology Research, https://nifa.usda.gov/announcement/usda-announces-46-millionnanotechnology-research, Accessed: 4 June 19.

Wang, Y., Sun, C., Zhao, X., Cui, B., Zeng, Z., Wang, A., Liu, G., Cui, H. (2016). The Application of Nano-TiO2 Photo Semiconductors in Agriculture. Nanoscale Res. Lett. 11.

Weinstock, M. (2005). The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. Brain. Behav. Immun. 19, 296–308.

Willeke, K., Baron, P. (2001). Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications. Van Nostrand Reinhold.

Wong, B.A. (2007). Inhalation Exposure Systems: Design, Methods and Operation: Toxicol. Pathol. 35:3-14.

Yeh, H.C., Snipes, M.B., Eidson, A.F., Hobbs, C.H., Henry, M.C. (1990). Comparative Evaluation of Nose-Only Versus Whole-Body Inhalation Exposures for Rats—Aerosol Characteristics and Lung Deposition. Inhal. Toxicol. 2, 205–221.

Yi, J., Chen, B.T., Schwegler-Berry, D., Frazer, D., Castranova, V., McBride, C., Knuckles, T.L., Stapleton, P.A., Minarchick, V.C., Nurkiewicz, T.R. (2013). Whole-Body Nanoparticle Aerosol Inhalation Exposures. J. Vis. Exp. JoVE.

Yin, J., Kang, C., Li, Y., Li, Q., Zhang, X., Li, W. (2014). Aerosol inhalation exposure study of respiratory toxicity induced by 20 nm anatase titanium dioxide nanoparticles. Toxicol. Res. 3, 367.

3. Résultats complémentaires

3.1. Stabilité des distributions granulométriques

3.1.1. Stabilité spatiale

Des mesures de distribution granulométrique d'un aérosol généré à partir d'une solution de chlorure de potassium (KCl) (concentration de 30 mg/L) a été réalisée grâce au SMPS en deux points (Figure 39A) situés à 1 cm au-dessus du sol (zone respiratoire) et au niveau de la zone de prélèvement du compteur de particules (~ 20 cm de hauteur). Ces résultats montrent la cohérence des distributions granulométriques entre les deux points de prélèvement (Figure 39B). Ceci est en accord avec la simulation CFD des concentrations particulaires et permet de valider la représentativité des résultats entre le point de prélèvement situé au-dessus de la chambre et la zone respiratoire des animaux située au niveau du sol de la chambre.

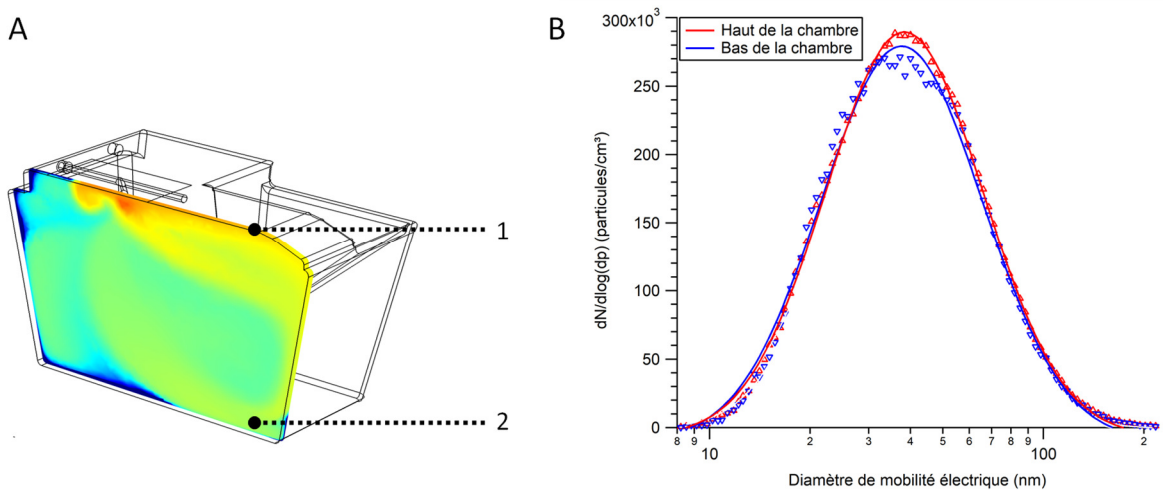


Figure 39. Homogénéité spatiale des aérosols, (A) image de la cage issue de la simulation CFD illustrant les deux points de mesure, (1) haut de la chambre, (2) bas de la chambre. (B) Mesures SMPS de la distribution granulométrique d'un aérosol de KCl modèle en deux points de la chambre d'exposition, dans la zone respiratoire des animaux (bas) et au point de prélèvement du CPC 3007 (haut).

3.1.2. Stabilité temporelle

De façon complémentaire aux résultats présentés dans l'article, la Figure 40 illustre la stabilité temporelle des distributions granulométriques obtenues pour chacun des aérosols d'intérêt. Les diamètres de mobilité électrique ont ainsi été représentés en fonction du temps, mesurés au cours de

deux heures de génération continue des aérosols, en intégrant sous forme d'échelle de couleur les valeurs obtenues des concentrations particulaires en nombre. Ces matrices (Fig. 40A, B et C) sont constituées des mesures réalisées au SMPS avec un pas de temps de 150 secondes, chacune des matrices comprenant les valeurs moyennes obtenues lors de la phase de caractérisation. Les données montrent également la stabilité et la faible variabilité des diamètres médians associés à chacun des différents aérosols au cours du temps (Fig. 40D).

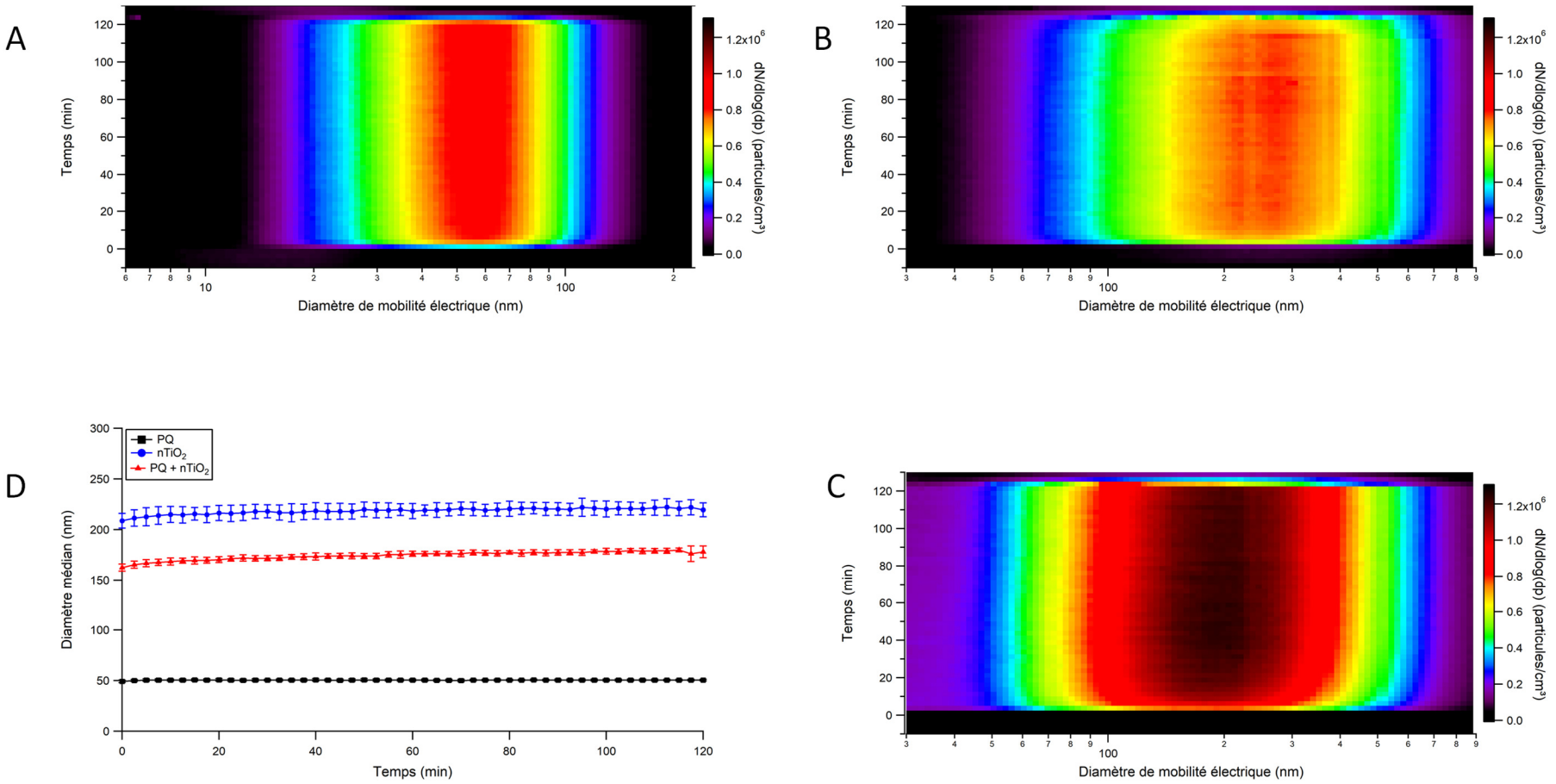


Figure 40. Mesures SMPS sous forme de matrices temporelles de la distribution en taille moyenne des aérosols issue de la phase de caractérisation pour le (A) PQ, (B) $nTiO_2$ et (C) PQ + $nTiO_2$ au cours de deux heures de génération en continu ; T=0 correspond au lancement de la génération, et T=120 correspond à son arrêt ; (D) évolution des diamètres médians de mobilité électrique, présentés sous forme de moyennes ± écart-type.

3.2. Analyse morphologique (MEB/EDX)

Des prélèvements réalisés grâce au MPS sur des grilles de microscopie électronique (débit de prélèvement : 0,3 L/min) ont été effectués afin de caractériser la morphologie des particules associées à la génération d'aérosols du PQ, $nTiO_2$ et du PQ + $nTiO_2$, et pour qualifier l'interaction entre le PQ et le $nTiO_2$ en mélange. Les figures ci-dessous présentent des clichés obtenus en MEB pour chaque type d'aérosol avec leurs analyses EDX associées pour caractériser leur composition chimique élémentaire. Parmi les signaux EDX obtenus pour toutes les analyses réalisées, l'aluminium provient du porte échantillon, le cuivre et le carbone de la grille de microscopie.

La Figure 41 présente les résultats obtenus avec le PQ seul, en utilisant un temps de prélèvement de 30 à 600 secondes. Il est à noter que le PQ seul et en mélange n'a pas été identifié durant ces analyses. Plusieurs types d'objets sont visibles, bien que leur identification ait été rendue difficile par le faible dépôt de PQ sur les grilles, probablement en lien avec le minimum d'efficacité de prélèvement du système MPS dans la gamme de taille associée à la distribution granulométrique du PQ. Par ailleurs, il est probable que l'énergie du faisceau d'électrons du MEB ait limité cette caractérisation, car il a rapidement provoqué la sublimation des particules sur lesquelles la mise au point était faite, comme en témoignent les deux clichés de ce qui pourrait être des particules de PQ avec un aspect de type « goutte » (41A). Les analyses EDX sont présentées en Figures 41B et 41C pour essayer de caractériser la signature spectrale du PQ ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$). Les mesures effectuées ont mis en évidence les éléments suivants: azote, oxygène, magnésium, silice et chlorure. La présence des éléments chlorure et azote peut témoigner d'une signature du PQ. Cependant, leur signal étant très faible, il est difficile de conclure clairement quant à la composition des particules détectées.

Concernant le $nTiO_2$ seul, la Figure 42 présente les résultats obtenus en utilisant un temps de prélèvement de 5 à 30 secondes. La diversité de taille des agrégats et agglomérats de $nTiO_2$ et l'identification d'agglomérats pseudo-sphériques sont en accord avec les résultats attendus. L'analyse EDX a mis en évidence les éléments suivants (Figure 42B) : magnésium, silice et titane. Les signaux associés au titane sont clairement identifiés.

Les résultats associés au mélange PQ + $nTiO_2$ sont présentés au sein de la Figure 43, un temps de prélèvement de 5 à 60 secondes a été utilisé. Il s'est avéré que la morphologie de l'aérosol associé au mélange (Figure 43B) est comparable au $nTiO_2$ seul. L'analyse EDX a mis en évidence les éléments suivants : N, O, Mg, Si, P, Cl et Ti. À l'instar du $nTiO_2$ seul, le titane est facilement identifiable. Par ailleurs, de façon similaire à l'analyse du PQ seul, les signaux associés à l'azote et au chlore étant très faibles, il est difficile de conclure clairement quant à la composition des particules détectées. Aucune particule composée d'un mélange interne n'a été identifiée.

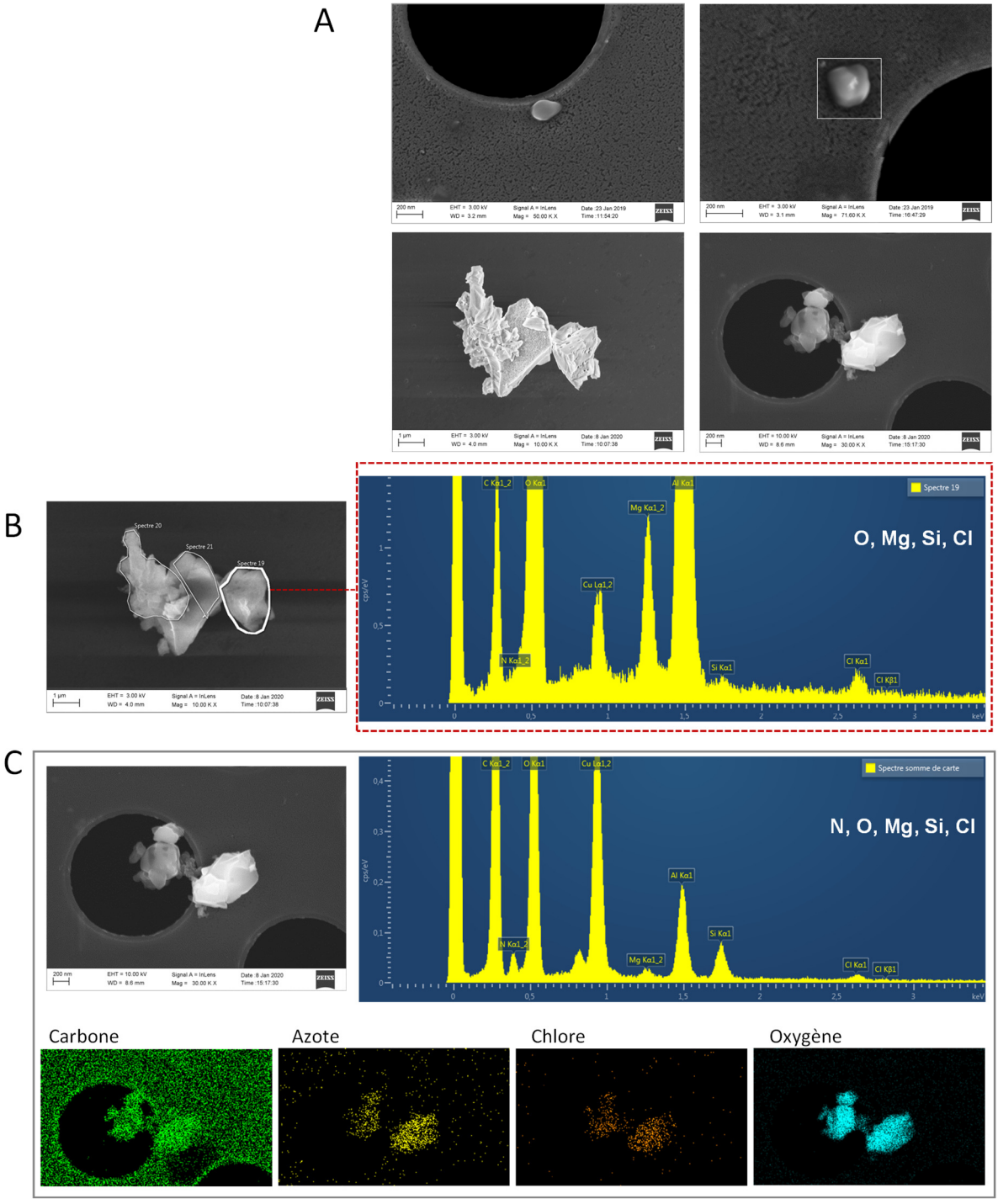


Figure 41. Analyse du PQ sur grilles de MET Quantifoil 1.2/1.3. (A) clichés en MEB (temps de prélèvement jusqu'à 600 sec), (B) analyse EDX ponctuelle sur un échantillon de particules, (C) analyse EDX.

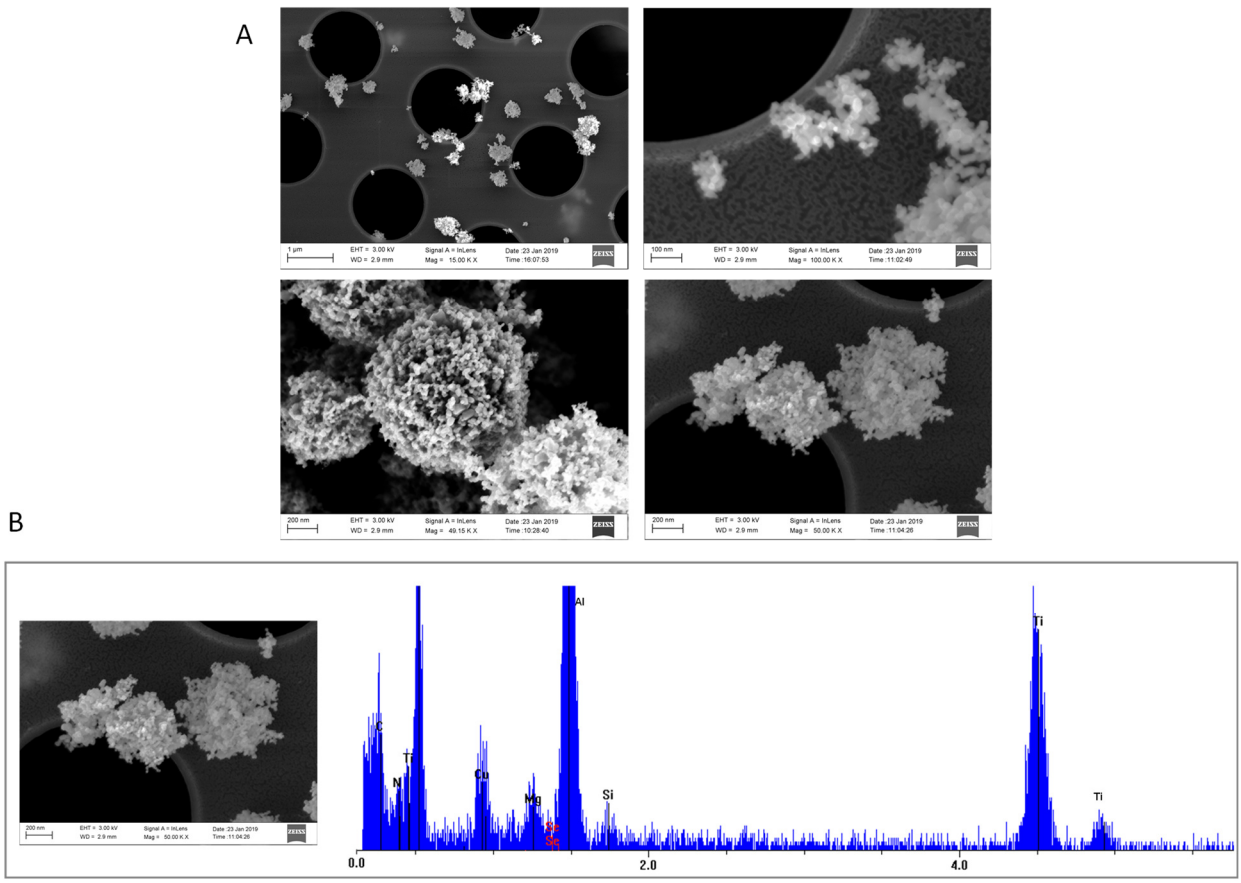


Figure 42. Analyse du $nTiO_2$ sur grilles de MET Quantifoil 1.2/1.3. (A) clichés en MEB (temps de prélèvement de 5 secondes à 30 sec), (B) analyse EDX.

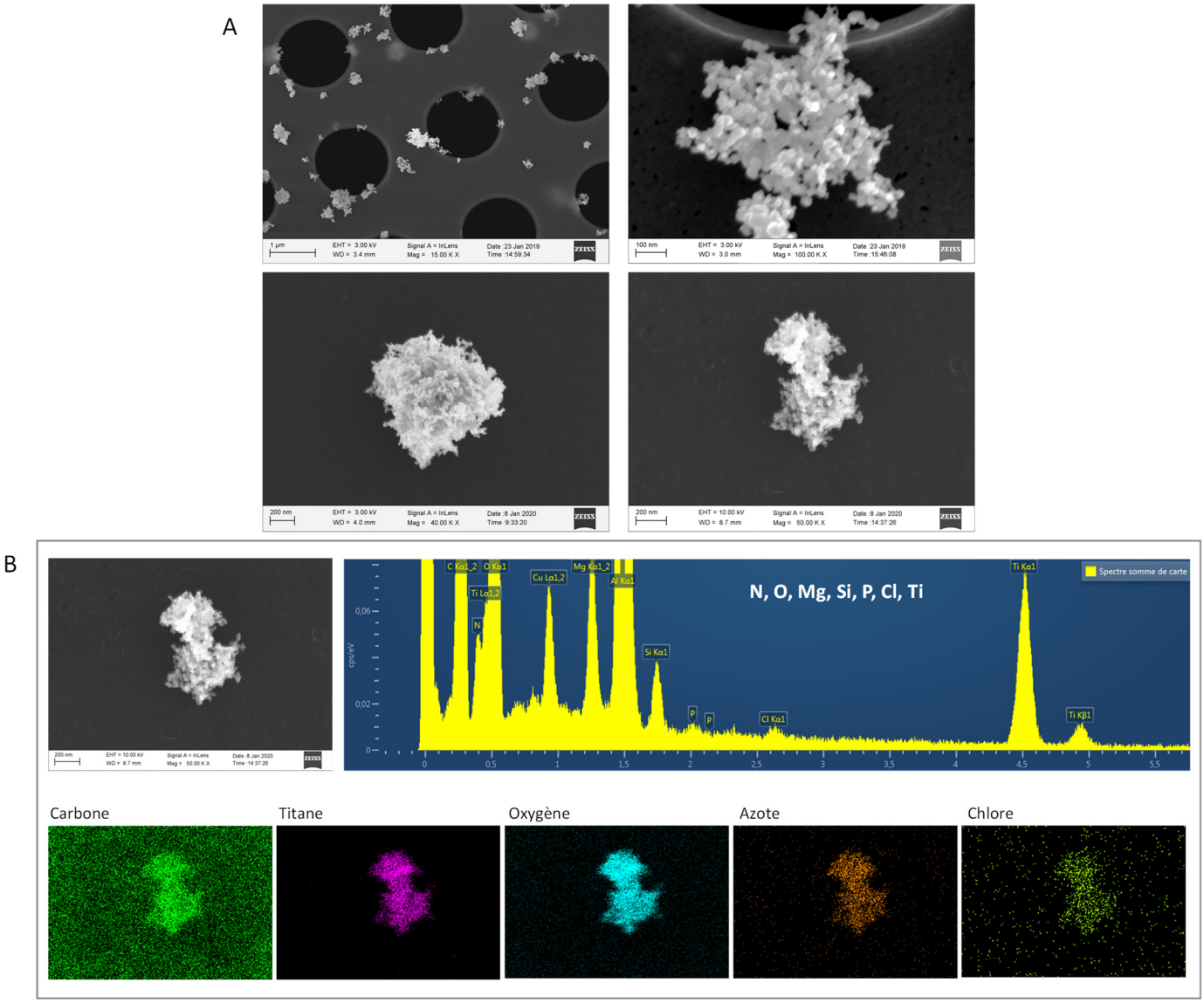


Figure 43. Analyse du PQ + $nTiO_2$ sur grilles de MET Quantifoil 1.2/1.3. (A) clichés en MEB (temps de prélèvement jusqu'à 60 sec), (B) analyse EDX ponctuelle sur un échantillon de particules, (C) analyse EDX.

3.3. Suivi métrologique lors des expositions des animaux

Lors des deux campagnes d'exposition des animaux effectuées durant ce travail de thèse, un suivi quotidien des concentrations en nombre a été réalisé, en association avec des mesures gravimétriques. Les résultats issus de la caractérisation et des campagnes d'exposition sont résumés dans le Tableau 12 et le suivi en temps réel des concentrations en nombre moyennes est présenté en Figure 44.

Tableau 12. Résultats des mesures métrologiques réalisées durant les campagnes d'exposition.

	Concentration en nombre [× 10^3 particules/cm³]		
Aérosol	Caractérisation	Campagne exposition 1	Campagne exposition 2
PQ	258 (11%)	249 (7%)	271 (9%)
$nTiO_2$	205 (10%)	202 (8%)	210 (9%)
PQ + $nTiO_2$	292 (8%)	308 (9%)	295 (15%)
	Concentration massique (mg/m³)		
Aérosol	Caractérisation	Campagne exposition 1	Campagne exposition 2
PQ	98,7 [× 10^{-3}] (3%)	-	11,2 [× 10^{-2}] (13%)
$nTiO_2$	10,2 (9%)	10.1 (7%)	10,2 (8%)
PQ + $nTiO_2$	10,2 (4%)	9.9 (8%)	10,1 (9%)

«-» : Donnée manquante ; la mesure de la concentration massique en PQ lors de la campagne 1 n'a pas été possible pour des raisons techniques sur la plateforme du PBES.

Mesures métrologiques réalisées durant la caractérisation et les deux campagnes d'exposition des animaux, avec les souris gestantes C57Bl6/J (campagne exposition 1 [NeuroDev], 11 jours d'exposition) et les souris adultes TgM83 (campagne exposition 2 [NeuroTox], 36 jours d'exposition). Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes obtenues sur l'ensemble de la durée de l'étude, ± (écart-type relatif). Une comparaison statistique des moyennes intra-groupes (PQ, $nTiO_2$ et PQ + $nTiO_2$) a été réalisée grâce à un test ANOVA suivi de tests de comparaisons multiples de Dunnett, qui permet de comparer toutes les modalités avec une modalité de contrôle (choisie comme étant la phase de caractérisation), aucune différence significative n'a été observée au seuil de 5% entre les moyennes issues des expositions des animaux et les celles issues de la phase de caractérisation.

Les données issues des différentes phases de l'étude illustrent la reproductibilité de la procédure d'exposition des animaux. Les résultats obtenus lors des campagnes d'exposition montrent une concordance avec ceux issus de la caractérisation métrologique, utilisés comme valeurs de référence. Concernant les concentrations en nombre, la déviation des valeurs moyennes obtenues était inférieure ou égale à 5% entre les phases de caractérisation et d'exposition. Les concentrations mesurées quotidiennement sont conformes à la limite fixée par les lignes directrices de l'OCDE (OECD TG 403, 412, 413) qui indiquent que les concentrations d'exposition ne doivent pas s'écarter de la valeur de référence de plus de 20%. Par ailleurs, les écart-types relatifs de reproductibilité étaient compris entre 7% et 15% pour les concentrations en nombre, et entre 3% et 13% pour les concentrations massiques.

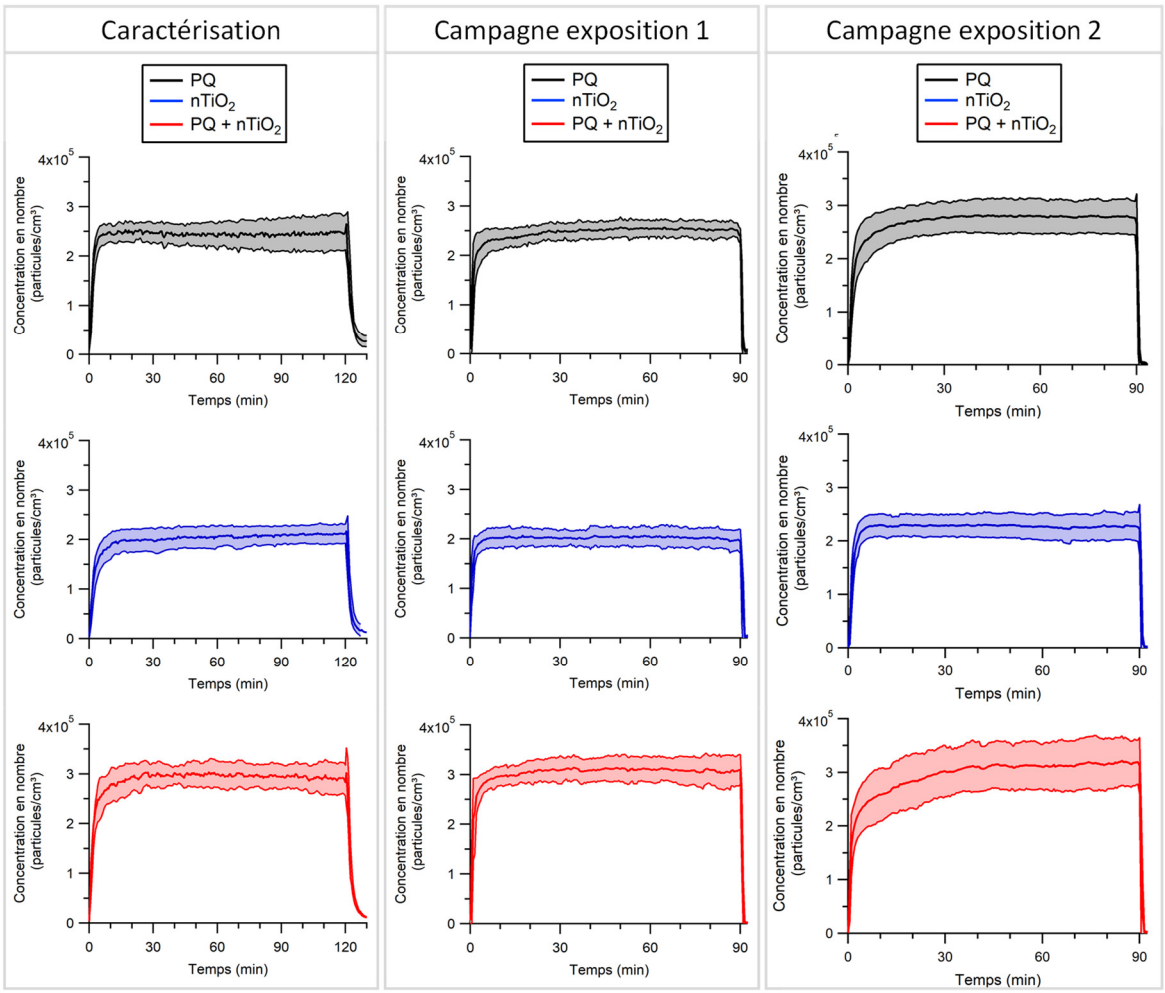


Figure 44. Suivi en temps réel des concentrations en nombre moyennes (± écart-type) mesurées lors de la caractérisation (2h de génération, 10 essais) et des deux campagnes d'exposition des animaux (1,5h de génération, 11 et 36 sessions pour la campagne 1 et 2 respectivement). Lors de l'exposition des souris TgM83 (campagne exposition 2) à l'aérosol de PQ + $nTiO_2$, une variation anormale du taux de dilution du CPC 3007 a été observée induisant un débit d'échantillonnage des particules décroissant lors des 30 premières minutes de génération (durant 3 semaines sur les 7 semaines d'exposition). Ceci a eu pour effet d'augmenter son facteur de dilution. La révision du CPC par le constructeur a permis de remédier à cet incident technique.

Chapitre 3. Étude nanotoxicologique

VIII. Matériels et méthodes

1. Modèle animal

Les souris sont les animaux les plus utilisés au cours des protocoles de recherche (Ministère de l'Éducation supérieure, de la Recherche et de l'Innovation, 2019). Il existe un grand nombre d'avantages à travailler avec ces animaux : petite taille, faible coût, manipulation aisée, taux élevé de reproduction, taille des portées (4 à 12 souriceaux) etc. Également, ils présentent une similitude génomique importante avec l'homme (99% de gènes partagés, Sanger institute, The Measure of Man). Elles présentent un fond génétique connu et homogène entre individu, permettant de réduire au mieux les facteurs de variabilité inter-individuelle. Deux lignées murines complémentaires ont été utilisées dans cette étude, la souche sauvage C57Bl/6J et la lignée mutante TgM83 (fond génétique C57Bl/6J et C3H).

Préalablement à ce travail de thèse, une étude a été réalisée à l'ANSES sur la souris (lignée C57Bl/6J) exposée à des aérosols de $nTiO_2$ dans le cadre d'un scénario d'exposition de travailleurs du secteur du bâtiment. Il a été montré que les animaux exposés à des aérosols issus de l'abrasion de matériaux nanoadditivés présentaient une baisse de leurs capacités motrices à partir de 4 semaines, à raison d'1,5 h d'exposition par jour (5 jours/semaine). Cette baisse était visible à la suite d'expositions à des aérosols produits à partir d'une peinture commerciale photocatalytique comprenant 9% en masse de $nTiO_2$, au contraire d'une peinture n'en contenant pas. Ces données (non publiées) ont donc été utilisées comme base pour établir un protocole d'exposition chez la souris en termes de durée d'exposition.

1.1. Étude sur le neurodéveloppement : NeuroDev (C57Bl6/j)

La lignée de souris C57Bl6/j a été utilisée pour étudier les effets de l'exposition répétée aux aérosols d'intérêt durant la gestation sur la descendance. Grâce à la plateforme de séquençage haut-débit de l'IGFL, les altérations possibles du transcriptome cérébral des souriceaux exposés *in utero* ont ainsi été analysées. Chez la souris, le neurodéveloppement commence avec la formation du tube neural et le développement de la microglie entre les jours de gestation 7,5 et 10, ce qui correspond à la 3ème et 4ème semaine de gestation chez l'homme (Gumusoglu and Stevens, 2019). L'exposition des femelles gestantes a commencé à partir de l'implantation des embryons (6ème jour de gestation) pour éviter les potentielles pertes préimplantatoires dues aux substances inhalées, tout en permettant une exposition tout au long du neurodéveloppement intra-utérin. Les expositions ont été réalisées jusqu'au 18ème jour de gestation, en amont de la date théorique de la mise-bas (jour 19,5 de gestation), afin d'éviter d'induire un stress périnatal chez les souris gestantes pouvant mettre en péril la survie de la progéniture. Les souriceaux ont été mis à mort au 14ème jour de vie post-natale, période à laquelle les principaux processus neurodéveloppementaux sont terminés. C'est une période bien décrite dans la littérature, sur laquelle

s'appuient de nombreux projets de recherche, comme ceux mis en place dans l'équipe de l'IGFL « Génomique Fonctionnelle de la signalisation thyroïdienne » dans laquelle a eu lieu cette étude.

1.2. Étude subchronique sur la souris adulte : NeuroTox (TgM83)

C'est un modèle murin obtenu par transgénèse à partir de souris B6C3H, issues d'un croisement entre les lignées C57Bl/6J et C3H. Comme toute les lignées murines, il est sujet à une possible dérive génétique pouvant affecter la qualité du transgène au cours du temps et des reproductions successives (Casellas, 2011). À cet égard, un génotypage pour contrôler la présence du transgène a été effectué à l'arrivée des souris à l'animalerie du PBES en amont des expérimentations.

La lignée TgM83 de souris transgéniques exprime la protéine asyn humaine mutée en position A53T, mutation identifiée dans des cas familiaux de MP (Giasson et al., 2002). Cette mutation est désignée par le terme A53T, car la protéine asyn est mutée au niveau du résidu 53 (remplacement de l'Alanine par la Thréonine). Ces souris développent spontanément des symptômes moteurs caractérisés par l'apparition à partir de 7 mois d'une rigidité des membres postérieurs associée à une démarche anormale. Une publication de Bencsik et al. (2014) a montré que ce symptôme est associé à l'apparition de la forme phosphorylée de l'asyn dans le SNC. L'apparition de cette forme phosphorylée se fait à partir de l'âge de 3,5 mois en débutant par des inclusions périnucléaires d'asyn suivies de dépôts typiques intracytoplasmiques détectables de façon croissante dans le cerveau des animaux. L'usage de ce modèle prédisposé à développer un syndrome parkinsonien permet donc de mimer l'exposition d'une population vulnérable aux effets neurotoxiques potentiels de nos substances d'intérêt.

2. Protocoles d'exposition

Les expérimentations ont été menées conformément à la réglementation européenne concernant la protection des animaux à des fins scientifiques (directive européenne 2010/63 / UE). Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique local (CECCAPP) et le ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur (CECCAPP_ENS_2019_015). Les souris ont été hébergées dans des conditions environnementales standard (humidité de 55 ± 10% ; température de 22 ± 2 ° C ; cycle lumière / obscurité de 12/12 h) au Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (SFR BioSciences Gerland - Lyon Sud, France Accréditation N ° D54-547-10). Les animaux avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à un régime alimentaire adapté à leurs besoins métaboliques. L'installation de la chambre d'exposition aux aérosols utilisée à l'animalerie est présentée ci-dessous (Figure 45).

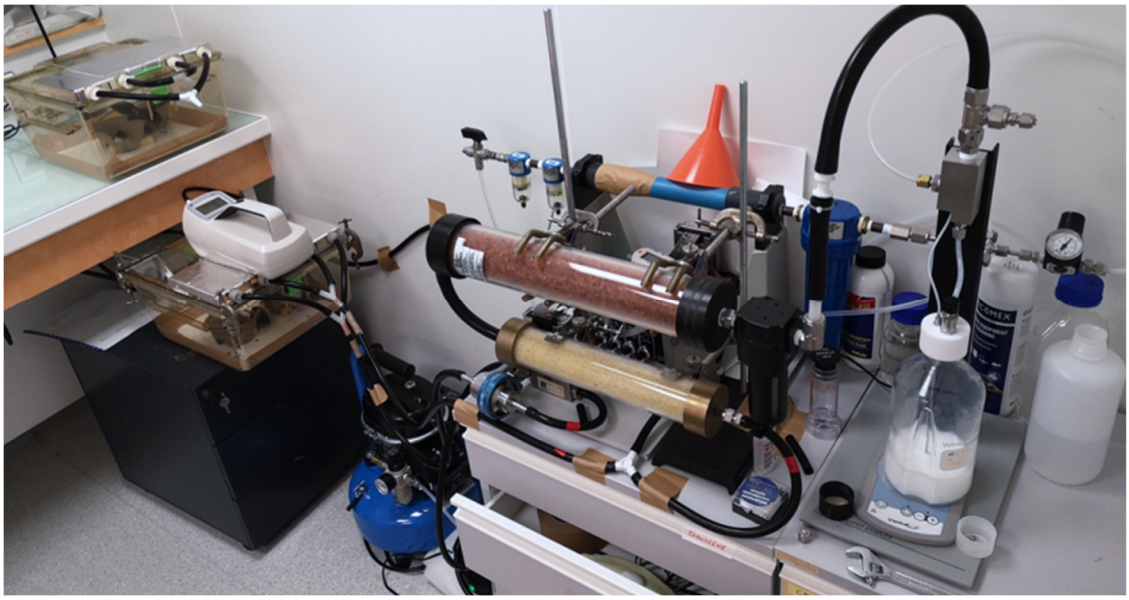


Figure 45. Photographie de la chambre d'exposition aux aérosols utilisée à l'animalerie (PBES, ENS de Lyon) lors des phases expérimentales. Les animaux exposés aux aérosols et les animaux servant de groupe témoin (sur la paillasse), ont été placés dans deux cages identiques. Un enrichissement des cages ne gênant pas la circulation des aérosols a été utilisé (objets à ronger, structures en carton) afin de privilégier un comportement exploratoire des souris. En absence de tout objet dans leur milieu, les animaux s'agglutinent les uns sur les autres, ce qui peut prévenir l'inhalation des aérosols.

2.1. Étude du neurodéveloppement (NeuroDev)

Des femelles primipares C57Bl/6J (première gestation) âgées de 2 mois ont été commandées (CHARLES RIVER LABORATORIES, France) et reçues 48 heures avant le début des expositions

(hébergement de deux femelles par cage, durant toute la durée du protocole). Les femelles étaient supposées gestantes à la suite de leur accouplement dans la nuit, confirmé par la présence d'un bouchon vaginal le lendemain matin. Douze animaux par groupe d'exposition ont été reçus pour cette étude. Chaque groupe était exposé à un seul aérosol (PQ, $nTiO_2$ ou PQ + $nTiO_2$), et le groupe témoin a été maintenu dans les mêmes conditions pendant la durée des séances d'exposition (sans exposition aux aérosols). Les expositions se sont déroulées en plaçant le groupe témoin dans une cage identique à celle utilisée pour les groupes traités aux aérosols, et située à proximité immédiate du dispositif (Figure 45). Ceci dans le but d'obtenir des conditions similaires entre groupes d'exposition et groupe témoin (manipulation animaux, promiscuité, bruit etc.). Chaque groupe d'exposition était composé de 12 souris exposées en même temps grâce au dispositif d'inhalation (Figure 46). Les expositions aux différents aérosols d'intérêt n'ont pas eu lieu durant les mêmes périodes. Les souris gestantes ont été exposées de façon répétée de leur 6ème à leur 18ème jour de gestation pendant 1,5 heure, pour un total de 11 séances d'exposition, comprenant un suivi individuel quotidien du poids corporel. Les femelles ont été laissées avec leur progéniture jusqu'au 14ème jour de vie post natale, jour de la mise à mort des souriceaux. Un suivi a été réalisé de la survie (du 1er au 14ème jour de vie post natale) et de l'évolution de la masse pondérale (du 6ème au 14ème jour de vie post natale) de la progéniture. Le suivi pondéral n'a pas commencé dès le premier jour, car les manipulations des nouveau-nés durant les premiers jours de vie diminue leur taux de survie, en provoquant un déficit de soins maternels de la part des souris primipares (Weber and Olsson, 2008).

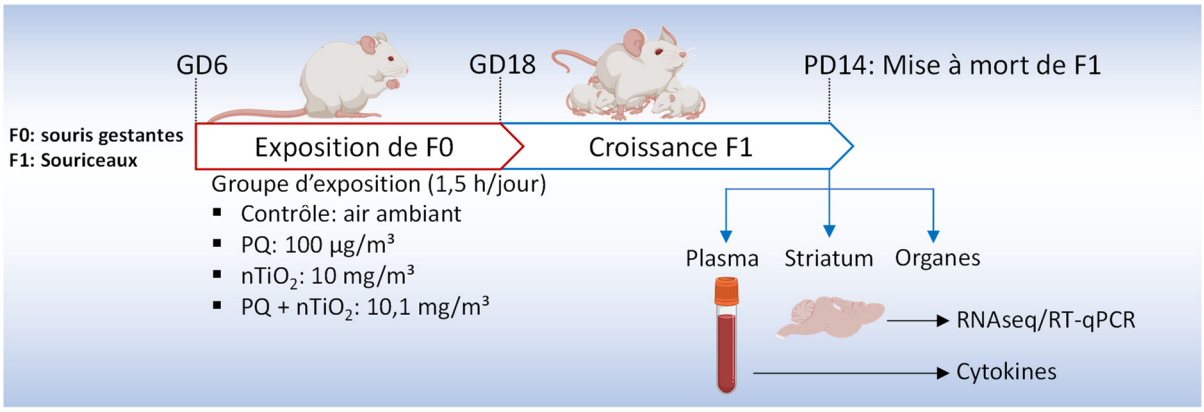


Figure 46. Protocole d'exposition des souris gestantes (C57Bl/6J). Groupes d'exposition composés de 12 souris/groupe. La durée de gestation chez la souris dure 19,5 jours. À l'issue de la période gestationnelle, 10 souris (sur les 12 supposées gestantes) ont donné naissance à des souriceaux dans les trois groupes d'exposition aux aérosols.

2.2. Étude de la neurotoxicité chez l'adulte (NeuroTox)

Les groupes d'exposition étaient constitués de 24 souris femelles TgM83 d'âge similaire (8 semaines au moment de la première exposition) afin d'optimiser l'homogénéité de leurs performances locomotrices. Chaque groupe était exposé à un seul aérosol (PQ, $nTiO_2$ ou PQ + $nTiO_2$) et le groupe témoin (sans exposition aux aérosols) a été maintenu dans les mêmes conditions pendant la durée des séances d'exposition. Seules des femelles ont été utilisées pour l'étude pour éviter l'accouplement des animaux lors des phases d'expositions. Ces dernières se sont déroulées en plaçant le groupe témoin dans une cage identique à celle utilisée pour les groupes d'exposition et placée à proximité immédiate du dispositif. Les animaux ont été exposés le matin 1,5 h/jour, 5 jours par semaine, pendant 4 (N=6/groupe), 5 (N=6/groupe), et 7 semaines (N=12/groupe) dans le but de réaliser des analyses histologiques *post-mortem*, associées à une recherche des doses retenues des substances d'intérêt dans les différents organes (Figure 47). La quantification du titane pulmonaire et cérébral est présentée dans ce manuscrit.

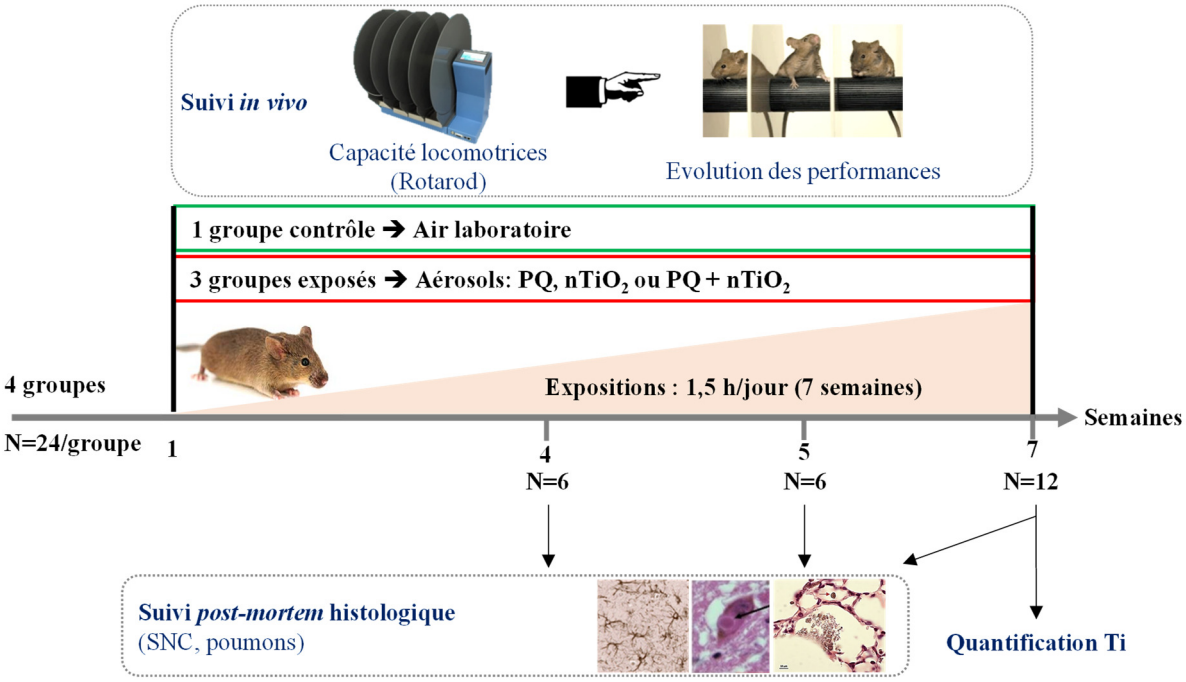


Figure 47. Protocole d'exposition des souris (TgM83), les groupes sont composés de 24 souris par conditions d'exposition (un groupe témoin et trois groupes d'exposition aux aérosols). Pour chaque temporalité (4 semaines, 5 semaines ou 7 semaines) 6 souris ont été utilisées pour le protocole histologique (18 souris en tout) et 6 souris (7 semaines) étaient dédiées à des quantifications *in situ* des substances d'intérêt.

3. Sacrifices et préparation des tissus

3.1. Protocole NeuroDev

Au 14ème jour de vie post natale, les souriceaux ont été pesés et ont reçu une injection intrapéritonéale (6 mL/kg) d'un mélange de kétamine (33 mg/mL) et de xylazine (6,7 mg/mL). Les groupes mis à mort étaient composés d'une proportion équilibrée de chaque sexe (50% mâles, 50% femelles). Un prélèvement sanguin a été réalisé à la veine cave, puis les souris ont été décapitées et les organes suivants ont été disséqués puis pesés : cerveau, foie, poumons, cœur et reins. Le cœur a été rincé au PBS pour éviter la présence de caillots sanguins. Certains cerveaux ont été conservés intacts et cryogénisés (N≥8 par groupe), d'autres ont été utilisés afin d'extraire les striatums (N≥24 par groupe). Le striatum a été sélectionné pour sa sensibilité aux effets toxiques du PQ, et son homogénéité cellulaire importante en comparaison des autres aires cérébrales (Richard et al., 2020), ce qui permet d'augmenter la sensibilité de détection des effets neurotoxiques potentiels de nos aérosols d'intérêt. La dissection cérébrale des striatums et des cervelets a été réalisée sous loupe binoculaire. Concernant la préparation des striatums, une tranche épaisse de télencéphale (approximativement entre les niveaux bregma 1,34 et bregma -0,22) a été découpée dans chacun des hémisphères, puis un cylindre de tissu a été récupéré au cœur du striatum, centré sur le caudate putamen (Figure 48). Les échantillons prélevés pour un individu donné ont été regroupés dans un même tube Precellys en prévision de l'extraction des ARN. Au cours de cette procédure, tous les organes ont été préservés sur carboglace ou azote liquide puis conservés à - 80°C. Le sang a été conservé dans des tubes héparinés sur glace, puis centrifugé 15 min à 2500 g pour récupérer le plasma qui a été regroupé par portée de souriceaux pour obtenir un volume suffisant en prévision de leur analyse, avant d'être congelé à - 80°C.

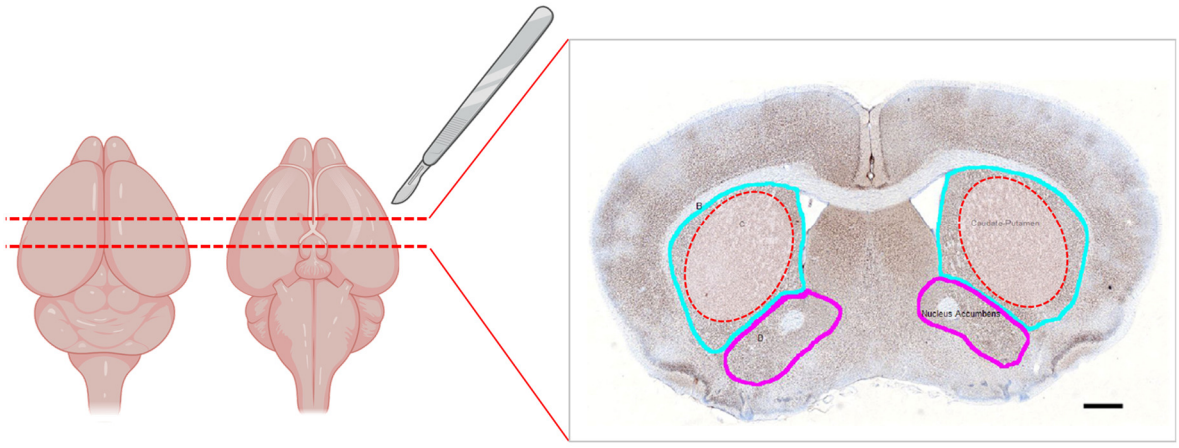


Figure 48. Illustration de la dissection réalisée au niveau du striatum. La région disséquée (entourée en rouge) est centrée sur le caudate putamen (bleu turquoise), en évitant le noyau accumbens (violet).

3.2. Protocole NeuroTox

Le lendemain de leur dernière exposition, les animaux ont été anesthésiés par injection intra-péritonéale (6 mL/kg) d'un mélange de xylazine (6,7 mg/mL) et kétamine (33 mg/mL). Le sang a été extrait par prélèvement intracardiaque dans le ventricule gauche, puis conservé dans des tubes héparinés sur glace, pour être centrifugé 15 min à 2500 g afin de récupérer le plasma. Ils ont été ensuite congelés à - 80°C. Dix-huit animaux par groupe ont été dédiés à la préparation des analyses histologiques (N=6 par groupe de mise à mort), les blocs cœur/poumons ont été extraits et canulés pour être perfusés à la Formaline 10% (solution commerciale de formol tamponné), à une pression constante de 20 cm de mercure pendant 10 min. Ils sont ensuite immergés dans le fixateur avant leur inclusion en paraffine. Les cerveaux ont été disséqués de façon à être prélevés dans leur intégralité avant d'être immergés dans la formaline. De la même façon, les autres organes (foie, reins, rate, yeux) ont été disséqués et laissés dans le fixateur à 4°C. Suite à leur prélèvement, les intestins ont été nettoyés et préfixés avec une solution de Bouin modifiée (50% éthanol, 5% acide acétique) pour être ensuite préparés selon la technique du Swill-rolling (Bialkowska et al., 2016). De plus, six animaux ont été dédiés à la quantification des substances d'intérêt *in situ*. Leurs organes ont été prélevés, pesés puis préservés sur carboglace ou azote liquide pour être ensuite conservés à - 80°C.

4. RNA-seq

Le transcriptome est défini comme l'ensemble des transcrits (ARN) présents dans un échantillon biologique. C'est la composante centrale de la régulation de l'activité cellulaire. Le séquençage par *RNA-sequencing*, ou RNA-seq, est aujourd'hui la technologie la plus utilisée pour l'analyse transcriptomique à grande échelle (Morozova et al., 2009), elle fait partie des techniques de séquençage de nouvelle génération. Le RNA-seq permet de s'affranchir de la connaissance *a priori* des gènes étudiés, en déterminant la séquence de tous les transcrits et leur abondance dans un échantillon, c'est pourquoi cette technique est qualifiée de technique d'analyse non-biaisée.

Les étapes de séquençage décrites dans ce paragraphe ont été réalisées grâce à la plateforme de séquençage haut-débit de l'IGFL. L'ensemble des ARN totaux a tout d'abord été extrait (RNeasy Mini kit, Qiagen). Pour améliorer la sensibilité du séquençage, l'échantillon a ensuite été enrichi en ARN polyadénylés, pour sélectionner les ARN messagers (ARNm), puis ils ont été fragmentés en morceaux de tailles aléatoires. Le séquençage requiert alors la ligation d'adaptateurs permettant la reconnaissance de l'ADN à séquencer, puis l'ADN a été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction). Une rétrotranscription a été faite pour générer des banques d'ADNc correspondants. Une fois les ADNc synthétisés, ceux-ci ont été fragmentés de manière à obtenir des longueurs de fragments nécessaires au

fonctionnement du système de séquençage, utilisant la technologie Illumina (Nextseq500 sequencer). Le séquençage permet finalement de mesurer l'abondance des transcrits de chaque gène, servant à déterminer leurs expressions relatives dans les différents groupes d'exposition aux aérosols, en comparaison du groupe témoin utilisé comme référence.

L'analyse différentielle de l'expression est réalisée en trois étapes : la normalisation, l'estimation de la variabilité et les tests statistiques associés. Par la suite, l'expression des transcrits peut être comparée entre les échantillons. L'une des méthodes fondamentales pour mesurer la variation d'expression est le calcul de ratio (ou fold-change), qui représente le rapport relatif d'un transcrit entre deux groupes d'exposition. La méthode Deseq2 (Love et al., 2014), disponible via la plateforme en ligne Galaxy[26] a été utilisée pour réaliser ces étapes de façon automatisée lors de cette étude. En bref, Deseq2 est un outil développé spécifiquement pour traiter les données de transcriptomique estimant la variabilité biologique des différents échantillons afin de les normaliser et de calculer des ratios moyens pour chaque gène. L'analyse différentielle inter-gène est fondée sur la modélisation de leur distribution par une loi binomiale négative. L'estimation des paramètres de ce modèle se fait grâce à une estimation de la relation entre la variance et la moyenne des comptages. C'est à partir de ce modèle que les tests statistiques sont réalisés (tests de Wald utilisés par défaut).

5. Analyse Fonctionnelle GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)

L'analyse fonctionnelle permet de donner des pistes d'interprétation aux groupes de gènes trouvés différentiellement exprimés. Elle permet d'associer des ensembles de gènes dérégulés avec des processus biologiques. Les gènes décrits dans la littérature sont très souvent liés avec certains processus biologiques ou des fonctions moléculaires, dans lesquels ils sont connus pour être impliqués. Ces informations sont disponibles dans des bases de données, majoritairement la Gene Ontology (GO) (Gene Ontology Consortium, 2015) ou la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG pathways[27]). Des méthodes statistiques de calcul d'enrichissement permettent alors d'évaluer la surreprésentation de certains groupes de gènes associés à une même annotation (par exemple, une même voie biologique) par rapport à l'ensemble des gènes caractérisés.

La méthode GSEA a été utilisée pour identifier les voies biologiques qui sont statistiquement enrichies au sein des groupes d'exposition aux aérosols à partir des données normalisées de chaque gène fournies par l'analyse Deseq2 (Reimand et al., 2019). Elle permet d'associer des ensemble de gènes dérégulés avec des voies de signalisation connues des bases de données sans perte d'information. GSEA a été utilisé afin d'identifier l'enrichissement des réseaux de gènes associés à l'exposition gestationnelle

[26] https://usegalaxy.org
[27] https://www.genome.jp/kegg/

aux aérosols d'intérêt en comparaison du groupe témoin. L'enrichissement d'un groupe de gènes a été considéré significatif lorsque la FDR (False Discovery rate) était inférieure à 5%, sur la base de 1000 permutations effectuées sur l'ensemble de la liste des groupes de gènes utilisés pour l'analyse statistique. La FDR est une méthode de calcul du taux d'erreurs dans les tests statistiques comprenant des comparaisons multiples, qui tiennent compte du nombre total d'analyses réalisées pour ainsi minimiser le risque d'erreurs dues au hasard (pondération des résultats par le nombre total de tests statistiques réalisés). Ces procédures de contrôle sont conçues pour évaluer la proportion théoriquement attendue de « fausses découvertes ». Pour ces analyses, plusieurs bases de données complémentaires ont été utilisées[28] : la base *C2:KEGG pathways*, *GO C5:Biological Process* et *Hallmarks gene sets*. Ces bases ont été choisies car elles permettent d'avoir un aperçu global des nombreuses fonctions biologiques et des situations pathologiques décrites dans la littérature. En s'appuyant sur les résultats produits par GSEA, une technique complémentaire de visualisation a été utilisée pour représenter les résultats sous forme de réseaux fonctionnels (ClueGO, logiciel Cytoscape développée par [Bindea et al., 2009]), capable de mettre en évidence les gènes communs aux différentes voies biologiques statistiquement enrichies.

6. Rotarod

Parmi les tests comportementaux existants pour évaluer les performances motrices des rongeurs, le test du Rotarod est particulièrement adapté pour tester la coordination et les capacités motrices des souris. Le Rotarod (Ugo Basile 47750 Rota-Rod) est composé d'un axe rotatif à la vitesse variable, associé à un détecteur de chute placé sous chacune des cinq voies permettant la course des souris (Figure 49). Cet outil permet de mesurer la durée pendant laquelle les animaux sont capables de courir sans tomber, et plusieurs types d'exercices peuvent être utilisés pour tester les performances des animaux (notamment à vitesse constante ou en accélération).

[28] https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/collection_details.jsp

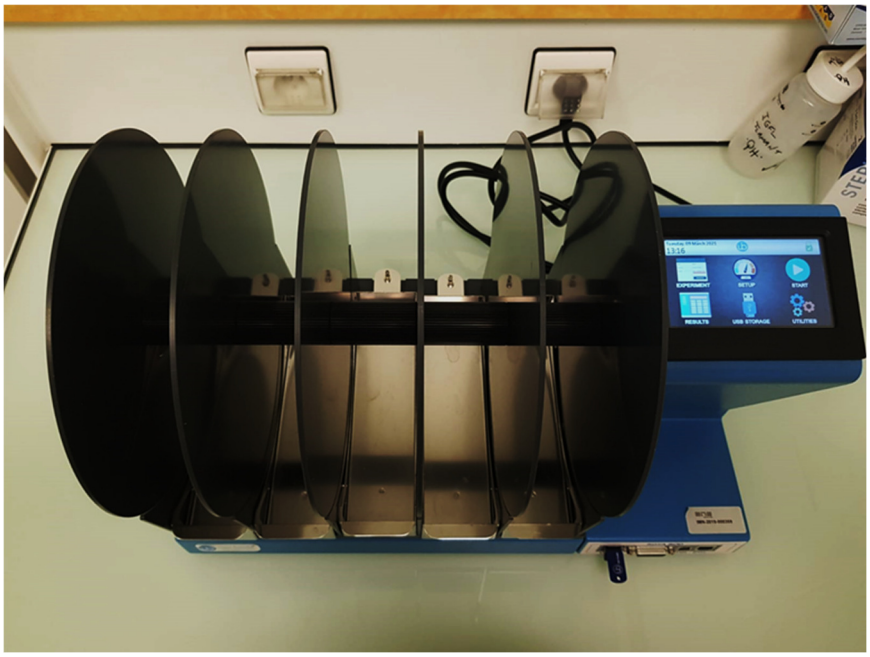


Figure 49. Photographie du Rotarod utilisé pour mesurer les capacités motrices des animaux exposés dans le cadre du protocole NeuroTox.

Les souris ont été entrainées au test du Rotarod, la semaine précédant leur première exposition aux aérosols, durant 4 jours consécutifs, afin de diminuer le stress induit par les manipulations et qu'elles se familiarisent avec le dispositif. Chaque jour d'entraînement, les animaux ont été placés trois fois sur le dispositif à une vitesse constante, de 5 à 20 rotations par minutes (rpm, augmentation de 5 rpm/jour jusqu'au 4ème jour d'entraînement). Au terme de l'entraînement, un niveau constant de performances a été atteint. Leurs performances ont été enregistrées le lendemain du dernier entraînement, afin d'obtenir une valeur de référence. Les animaux passaient deux tests, le premier étant réalisé en rotation continue (20 rpm, 5 min), et le deuxième en rotation avec accélération (de 5 rpm à 40 rpm, gradient linéaire pendant 2 min, durée totale de 2,5 min). Les performances ont été enregistrées de façon hebdomadaire pour chaque animal individuellement, chaque souris ayant trois tentatives pour chaque test. Les tests ont été réalisés entre 8h et 13h, sur deux jours consécutifs, un jour étant dédié à chacun des deux tests pour éviter l'introduction d'un biais dû à la fatigue des animaux.

7. Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-MS)

Les échantillons stockés à - 20°C ont été décongelés, pesés puis minéralisés en vase fermé au micro-ondes (Ethos One) durant 30 min à 200°C par un mélange de 6 mL d'acide nitrique optima à 67 - 69% et 0,5 mL d'acide fluorhydrique suprapur à 40% et 1 mL d'eau oxygénée suprapur 30%. Un étalon interne, le germanium, est également ajouté afin de corriger d'éventuels effets de matrice ou de pertes

lors de la minéralisation. Les échantillons minéralisés sont ensuite complétés avec de l'eau ultrapure MilliQ (18,2 MΩ·cm) jusqu'à 50mL. Finalement, des dilutions successives sont réalisées si nécessaire.

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre de masse à secteur magnétique avec ionisation par plasma à couplage inductif, utilisé en mode haute résolution (HR-ICP/MS) par le département « Biomédical et Chimie Inorganique » du LNE. Le HR-ICP/MS est une technique instrumentale multi-élémentaire qui se caractérise par sa grande sensibilité et sa rapidité d'analyse et qui permet la résolution de la plupart des interférences isobariques dues à la matrice de l'échantillon. La quantification a été effectuée selon la méthode standard (Sandrine Millour, 2015). Le comptage des ions a été effectué sur les isotopes ^{47}Ti, ^{48}Ti, ^{49}Ti, ^{72}Ge. Le HR-ICP/MS a été étalonné à l'aide de solutions étalons de référence de titane auxquelles le germanium est ajouté dans les mêmes concentrations que celles des échantillons. Les concentrations de titane ont été déterminées par interpolation sur une droite de régression linéaire. La méthode a été validée par ajout de titane nanoparticulaire sur des échantillons de placenta au moyen d'un matériau de référence le NIST1566b « Oyster tissue ».

8. Modélisation de la dose d'exposition via MPPD

Le dépôt des particules dans les différentes parties des voies aériennes a été évalué grâce au logiciel MPPD (version 3.04). Ce programme a permis de calculer la fraction de dépôt des aérosols utilisés et la dose déposée chez les animaux dans les voies aériennes supérieures, dans la zone trachéo-bronchique, et dans les bronchioles terminales et les alvéoles (appelée zone alvéolaire). Lors de la campagne d'exposition des souris gestantes (NeuroDev), la dose déposée dans la zone alvéolaire a été estimée pour être extrapolée à l'être humain (extrapolation par surface alvéolaire) sans prise en compte de la clairance. Au cours de la campagne d'exposition NeuroTox, la dose retenue dans la zone alvéolaire durant les 7 semaines d'exposition a été évaluée en intégrant la clairance pulmonaire, choisie sur la base de celle décrite précédemment chez le rongeurs (souris et rat) pour le $nTiO_2$ (Bermudez et al., 2004). La comparaison entre l'homme et la souris gestante de la dose alvéolaire déposée (alvéoles + bronchioles terminales) a été réalisée à partir du dépôt théorique estimé chez les deux espèces (Jarabek et al., 2005). Ce dépôt est calculé en divisant la dose déposée par la surface alvéolaire :

$$dépôt\ alvéolaire = \frac{concentration\ massique \times durée \times fraction\ de\ dépôt\ alvéolaire \times ventilation\ minute}{surface\ alvéolaire}$$

La fraction de dépôt est calculée par MPPD sur la base des valeurs issues de la caractérisation métrologique des aérosols d'intérêt (distribution granulométrique, concentration, morphologie, etc.), en utilisant les valeurs théoriques de diffusion, de sédimentation, d'impaction et d'interception estimées automatiquement par le logiciel. Plusieurs choix de paramètres d'entrée du modèle sont nécessaires pour comparer cette dose déposée en utilisant la surface alvéolaire comme facteur de pondération dans le

cadre d'un scénario d'exposition défini. Concernant les caractéristiques respiratoires des animaux, nous avons choisi une ventilation de 22 ml/min (souris de 20 - 25 g respirant spontanément au repos), sur la base des données obtenues avec la souche C57Bl/6J (Tankersley et al., 1994), et une surface alvéolaire de 0,05 m², comme rapportée dans la littérature (Stone et al., 1992). Les concentrations massiques moyennes mesurées lors des phases d'exposition pour chacun des aérosols ont été utilisées pour le calcul du dépôt alvéolaire chez la souris. Chez l'homme, un scénario théorique d'exposition professionnelle a été sélectionné, impliquant une femme travaillant durant sa grossesse. Une durée de 8 mois a été choisie (soit 160 jours ouvrés, en considérant 2 semaines de congés/an) associée à une ventilation par voie nasale (19 L/min) sélectionnée au regard de la littérature décrite chez la personne fournissant un effort léger durant son travail (Winter-Sorkina and Cassee, 2003), ce qui est également en accord avec la norme ISO/DIS 8996 associée à l'ergonomie de l'environnement de travail (Meyer And Horwat, 1998). Une surface alvéolaire humaine de 102 m² a été utilisée (Stone et al., 1992). Nous avons supposé qu'un travailleur pouvait être exposé jusqu'à 8 h par jour, 5 jours par semaine, 20 jours par mois en utilisant le modèle pulmonaire symétrique Yeh/Schum. Conformément aux limites d'exposition professionnelle recommandées par le NIOSH pour le $nTiO_2$ et le PQ, une concentration de 300 µg/m³ a été utilisée pour le $nTiO_2$ et de 100 µg/m³ pour le PQ.

9. Protocole d'analyses histologiques

9.1. Préparation des coupes cérébrales

Les préparations histologiques et les colorations immunohistochimiques ont été réalisées par le Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), par la Plateforme Anatomopathologie Recherche (Département de recherche translationnelle et d'innovation). Les tissus post-fixés ont été inclus en paraffine selon un protocole de routine à l'aide d'un automate. Des coupes d'une épaisseur entre 3 et 5 µm ont été réalisées puis recueillies sur lames afin d'être colorées en immunohistochimie. Cinq zones d'intérêt (Figure 50) ont été définies afin de rendre compte des possibles effets des expositions sur des structures cérébrales clés. Huit aires cérébrales ont été utilisées : les bulbes olfactifs (BO), le striatum (St), le cortex (Cx), le thalamus (Th), l'hippocampe (Hip), le mésencéphale (Mes), le tronc cérébral (Tc) et le cervelet (Ct).

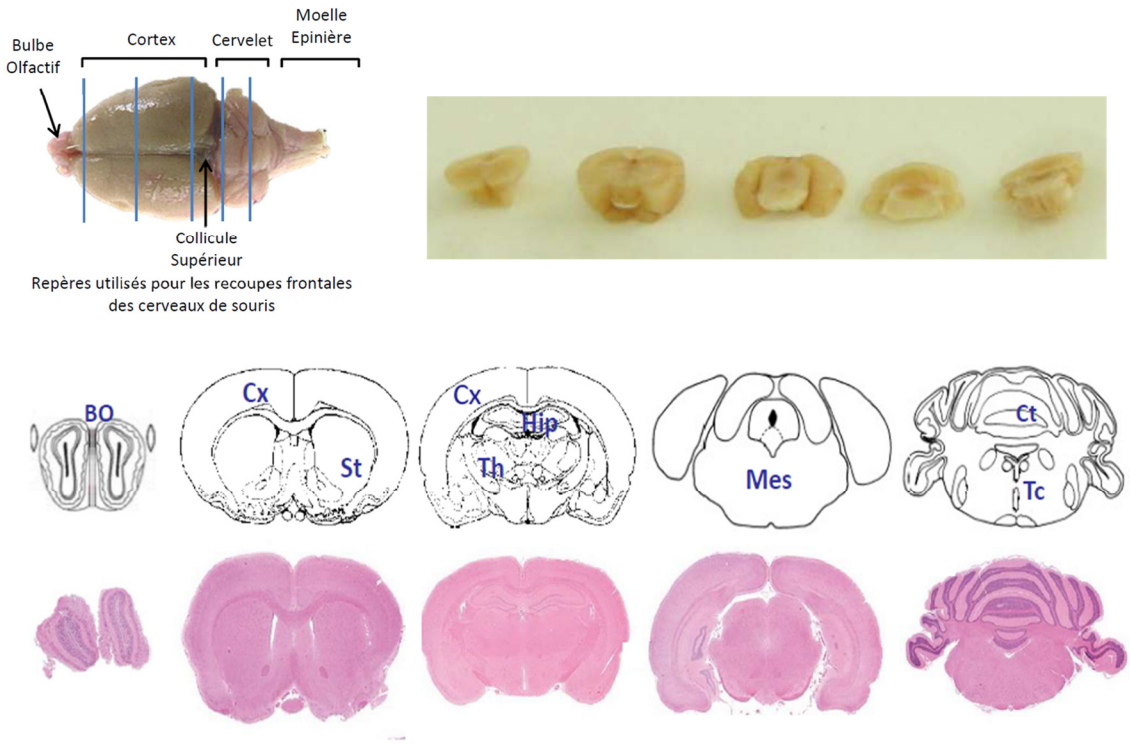


Figure 50. Illustrations et représentation schématique des repères utilisés pour l'obtention des coupes frontales cérébrales d'intérêt. BO: bulbes olfactifs ; St : striatum ; Cx : cortex ; Hip : hippocampe ; Th : Thalamus ; Mes : mésencéphale ; TC : tronc cérébral ; Ct : cervelet.

9.2. Colorations immunohistochimiques

Les cerveaux ont été collectés afin d'étudier l'effet des expositions sur deux populations gliales et une populations neuronale. Les astrocytes réactifs présentent une expression accrue de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), filament intermédiaire présent dans les astrocytes matures. Le marquage de la GFAP témoigne de l'accroissement du nombre de cellules astrocytaires ou de l'abondance de leurs prolongements cytoplasmique traduisant une réactivité astrogliale. La protéine Iba-1 (*Ionized calcium-Binding Adaptator molecule 1*) témoigne pour sa part de l'accroissement du nombre de cellules microgliales ou de changements morphologiques traduisant une réactivité microgliale. Ces deux marqueurs permettent de mettre en lumière une neuroinflammation potentielle. La tyrosine hydroxylase (TH) est un marqueur des neurones catécholaminergiques (sécrétant les catécholamines : Dopamine, Adrénaline et Noradrénaline). La TH est utilisée dans cette étude comme marqueur fonctionnel des neurones dopaminergiques.

Toutes les colorations immunohistochimiques (déparaffinage, prétraitements de démasquage antigénique et contre-coloration) ont été réalisées de façon automatisée. En bref, l'immunohistochimie est effectuée (Immunostainer, Ventana Discovery XT, Roche, Meylan, France) en utilisant le Kit DAB

Omnimap, selon les instructions du fabricant. Les coupes de cerveaux ont été incubées avec l'anticorps primaire, puis un anticorps secondaire (anti-lapin HRP) a été utilisé. La coloration apparaît ainsi avec une couleur brunâtre typique visualisée avec le substrat chromogène DAB (3,3'-Diaminobenzidine) lors de sa réaction avec la peroxydase. Puis les sections ont été contre colorées avec l'hématoxyline de Gill, avant d'être recouvertes d'une lamelle de verre. Des coupes sériées ont été réalisées (Figure 51) afin de mettre en évidence ces différents marqueurs de façon concomitante pour identifier les zones clés à quantifier. Celles-ci ont ensuite été numérisées afin d'être analysées via un logiciel dédié.

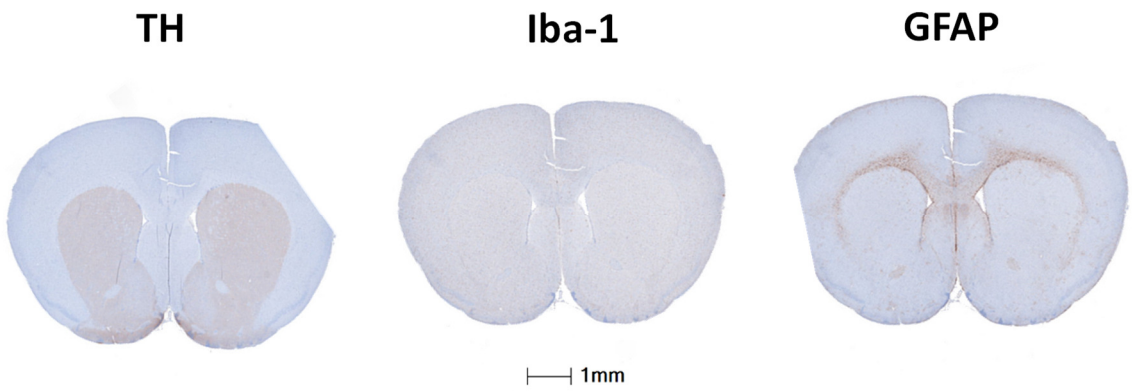


Figure 51. Exemple des coupes sériées du striatum de souris obtenues pour les trois colorations immunohistochimiques.

9.3. Analyse semi-quantificative du marquage immunohistochimique

L'analyse des coupes obtenues a été réalisée via le logiciel Halo (Indica Labs) permettant de quantifier les niveaux de marquage grâce des algorithmes de détection de l'intensité de coloration. Des masques représentant les zones d'intérêt ont été réalisés à partir d'atlas du cerveau de la souris[29,30] pour ajuster les images numérisées de chaque coupe obtenue (Figure 52). Ceci a permis de délimiter les différentes régions histologiques d'intérêt, puis de dessiner manuellement la surface totale de chacune des aires cérébrales au sein desquelles la quantification a été réalisée, tout en évitant d'inclure d'éventuels artefacts de préparation. À la suite de la mise en place des zones d'intérêt, le logiciel Halo a servi à quantifier (1) la surface relative de marquage positif (TH, GFAP) par rapport à la surface totale de l'aire cérébrale délimitée, (2) le nombre de cellules positives par unité de surface (Iba-1) en prenant en compte une mesure colorimétrique de fond pour obtenir un seuil de positivité adéquat.

[29] https://scalablebrainatlas.incf.org/mouse/ABA_v3
[30] https://mouse.brain-map.org/static/atlas

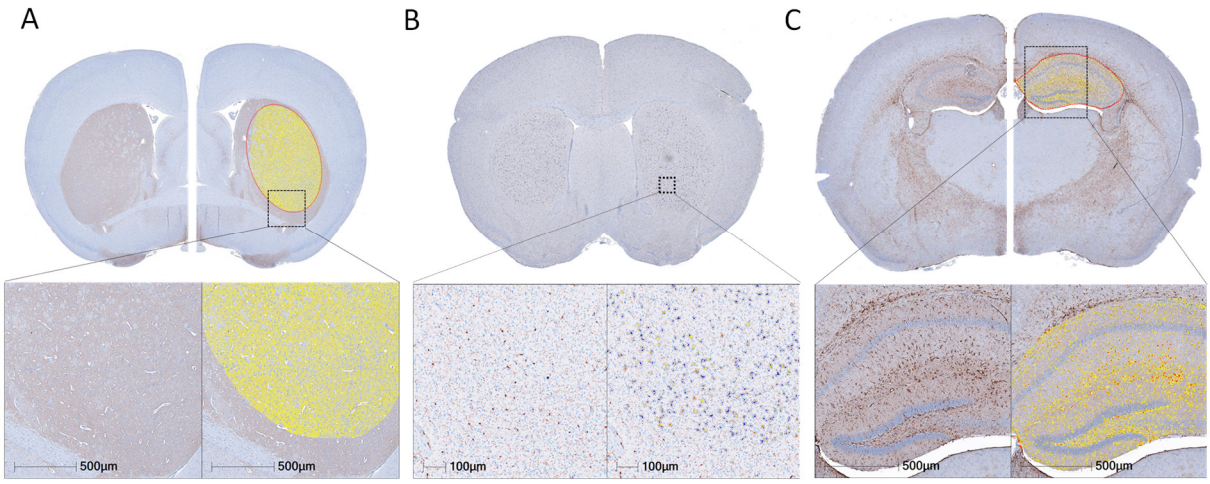


Figure 52. Illustration de la quantification du marquage immunohistochimique effectuée par algorithme pour (A) la TH (striatum), (B) Iba-1 (striatum), (C) la GFAP (hippocampe).

10. Détection des marqueurs inflammatoires plasmatiques

La technologie Luminex® (MAGPIX, ThermoFisher), disponible sur la plateforme AniRA ImmOs du plateau technique de la SFR Biosciences (UAR3444/US8), a été utilisée pour quantifier certaines cytokines inflammatoires et une métalloprotéase. Cette méthode associe la technique d'analyse ELISA (quantification enzymatique, ou *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) avec les capacités de détection de la fluorescence à haut-débit de la cytométrie en flux, grâce à des « billes » auxquelles sont fixés des anticorps de détection des protéines d'intérêt. Cette technique utilise des microsphères (de quelques micromètres) possédant une signature fluorescente spécifique, couplées avec un domaine dirigé vers une protéine. De cette manière, cette signature fluorescente permet de quantifier plusieurs protéines à la fois dans un surnageant de culture par l'usage de la cytométrie en flux (Figure 53).

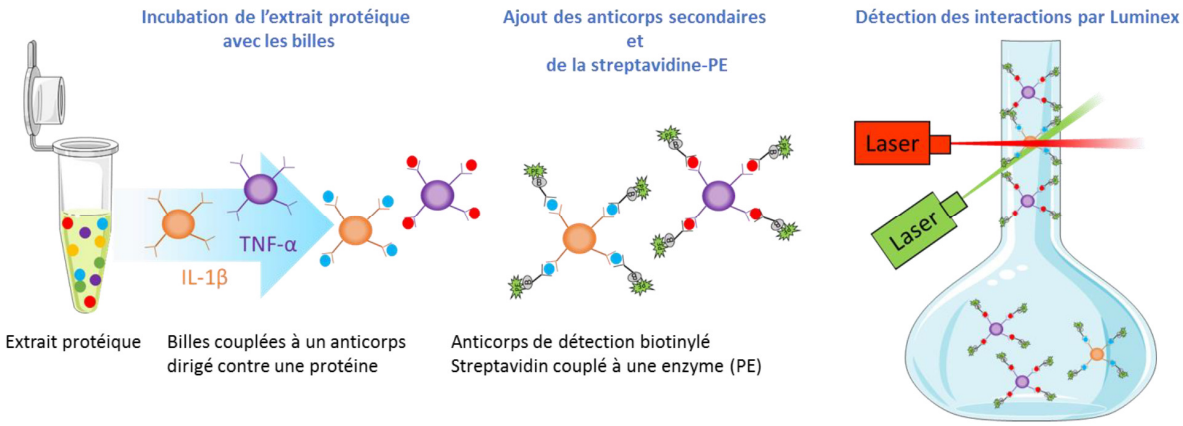


Figure 53. Principe de fonctionnement de la quantification enzymatique par Luminex®. L'utilisation de microsphères fluorescentes (de « billes ») permet une quantification simultanée de plusieurs marqueurs dans un même échantillon. Les microsphères sont incubées dans un milieu biologique d'intérêt puis rincées, ainsi seules les analytes couplés aux microbilles sont conservés dans le milieu. Ensuite, un anticorps de révélation marqué à la streptavidine-phycoérythrine (PE, enzyme fluorescente) est ajouté afin de pouvoir détecter et quantifier la fixation des anticorps avec leur partenaire protéique. Illustration issue du travail doctoral de (E. Paul, 2016).

IX. Effets neurodéveloppementaux associés à l'exposition *in utero* aux aérosols (NeuroDev)

Les résultats de cette partie sont présentés sous la forme d'un article soumis et accepté par la revue *Chemosphere* en Septembre 2021, intitulé : « *Prenatal exposure to paraquat and nanoscaled TiO_2 aerosols alters the gene expression of the developing brain* ».

1. Résumé de l'article

Contexte

Le développement des NPe suscite une inquiétude croissante relative au manque d'informations disponibles pour évaluer les impacts toxicologiques de ces nouvelles substances. Au regard du risque d'inhalation associé à la dérive des pesticides et du fait que certaines maladies neurodégénératives sont déjà décrites comme étant associées à l'exposition aux produits-phytosanitaires, notamment chez les populations exposées à des stades précoces, il apparaît nécessaire de proposer des modèles d'études pour cerner le risque représenté par l'inhalation des NPe. À notre connaissance, aucune étude par inhalation ne s'est penchée sur la survenue possible d'effets cocktails induits par une coexposition à un NM en mélange avec un pesticide. Pourtant, des effets additifs ou synergiques ont déjà été rapportés dans la littérature sur chez plusieurs espèces animales, montrant que la présence d'un NM peut moduler la toxicocinétique et la réactivité chimique d'un xénobiotique. Comme certains NM ont la capacité de traverser les barrières biologiques comme le placenta et la barrière hémato-encéphalique, la nano-formulation pourrait augmenter les effets neurotoxiques de certains pesticides, notamment sur le cerveau en développement. Comme preuve de concept, la génération d'aérosols de PQ et $nTiO_2$, seuls ou en mélange, a été réalisée pour exposer par inhalation des souris gestantes, afin d'explorer les risques d'altérations neurodéveloppementales chez la progéniture exposée *in utero*. Cet article présente l'étude des altérations de l'expression génique induites par l'exposition prénatale à nos aérosols d'intérêt, en utilisant une analyse transcriptomique du striatum des souriceaux.

Matériels et méthodes

Les souris gestantes ont été exposées durant 1,5h/jour, 6 jours/semaine, de leur 6ème jour à leur 18ème jour de gestation à trois aérosols, à savoir le PQ (0,1 mg/m³), le $nTiO_2$ (10 mg/m³) ou le mélange de PQ + $nTiO_2$ (0,1 mg/m³ de PQ + 10 mg/m³ de $nTiO_2$) dont la stabilité a été suivie durant les expositions en termes de concentrations particulaires en nombre et de concentrations massiques. Ce suivi, associé à la caractérisation préalable des aérosols, a permis d'estimer la dose pulmonaire reçue par les souris

gestantes afin de l'extrapoler via le modèle MPPD à l'être humain, dans le cadre d'un scénario d'exposition professionnelle durant la grossesse. Un suivi pondéral des animaux a été mis en place tout au long de l'étude, puis le prélèvement des différents organes d'intérêt a été réalisé au 14ème jour de vie post-natale chez la descendance exposée *in utero*, phase charnière du neurodéveloppement chez la souris. Une recherche de marqueurs pro-inflammatoires a été opérée dans le plasma des animaux, l'analyse du transcriptome a été effectuée par RNA-seq, et l'expression de 8 gènes marqueurs des différentes lignées cellulaires du SNC a été mesurée de façon complémentaire par RT-qPCR. Enfin, l'outil GSEA a été utilisé afin de mettre en évidence les groupes de gènes associés à des fonctions biologiques, qui ont été analysés comme différentiellement exprimés à la suite des expositions prénatales aux aérosols.

Résultats

L'analyse transcriptomique a mis en évidence que l'exposition prénatale aux aérosols a induit des effets significatifs sur l'expression génique mesurée dans le striatum des souriceaux, ce qui suggère des altérations neurodéveloppementales dans cette zone cérébrale clé. L'exposition au PQ seul a eu pour effet : l'augmentation d'un marqueur pro-inflammatoire plasmatique, la modification de l'expression génique d'un nombre important de gènes du striatum par rapport au groupe contrôle (2038 gènes), la modification de l'expression de plusieurs marqueurs des lignées cellulaires cérébrales, la dérégulation de groupes de gènes associés à des fonctions biologiques clés (fonction mitochondriale, myélinisation, croissance et projection neuronale…). Ces résultats suggèrent des effets du PQ qui ne sont pas limités seulement aux neurones dopaminergiques, et qui font écho à ceux décrits dans le développement de la maladie de Parkinson. L'exposition à l'aérosol de $nTiO_2$ a conduit : à la perturbation des voies biologiques associées à la régulation des neurotransmetteurs et des cytokines pouvant être le résultat d'une modulation de l'état neuroinflammatoire, à une augmentation d'un marqueur de la microglie, à la modification de l'expression génique d'un nombre significatif de gènes du striatum par rapport au groupe contrôle (1249 gènes). Ces effets rappellent ceux décrits dans la littérature chez la souris adulte mais exposée à des concentrations supérieures en $nTiO_2$. L'aérosol combinant PQ + $nTiO_2$ n'a pas provoqué d'effet cocktail additif ou synergique. Au contraire, l'amplitude de la dérégulation génique et le nombre de gènes différentiellement exprimés (287 gènes) étaient bien inférieurs à ceux des autres groupes d'exposition. À l'instar du groupe $nTiO_2$, l'altération des voies associées à la régulation des neurotransmetteurs a été mise en évidence, suggérant par ailleurs que cet effet visible du mélange semble être induit par le $nTiO_2$ indépendamment du PQ.

Conclusions et perspectives

Cet article témoigne de la sensibilité de la méthode utilisée, s'appuyant sur l'usage d'une chambre d'exposition aux aérosols et d'une analyse du transcriptome, afin de décrypter les effets développementaux de doses faibles considérées comme théoriquement sans effet toxique. Les données issues des animaux exposés aux aérosols de PQ et de $nTiO_2$ suggèrent que le risque lié à ces substances durant la phase critique du neurodéveloppement pourrait avoir été sous-estimé. Afin de confirmer la pérennité de ces perturbations de l'expression génique, des analyses complémentaires (histologiques et comportementales) devront être réalisées afin de confirmer ces premiers résultats. En outre, aucune augmentation de la toxicité du mélange PQ + $nTiO_2$ n'a été observée. De façon surprenante, il a été mis en évidence une diminution de la toxicité du mélange par rapport aux substances seules, ce qui nécessite une exploration plus approfondie des mécanismes impliqués dans l'interaction de ces deux substances en phase aérosol. Leur mélange pourrait en effet modifier la toxicocinétique du PQ, notamment en prévenant sa biodistribution dans l'organisme et en empêchant sa translocation placentaire.

2. L'exposition prénatale aux aérosols de paraquat et de $nTiO_2$ altère l'expression génique du cerveau en développement

Prenatal exposure to paraquat and nanoscaled TiO_2 aerosols alters the gene expression of the developing brain

Quentin Hamdaoui[1,2], Yanis Zekri[1], Sabine Richard[1], Denise Aubert[1], Romain Guyot[1], Suzy Markossian[1], Karine Gauthier[1], François Gaie-Levrel[2], Anna Bencsik[3], Frédéric Flamant[1]

[1]*IGFL, Functional genomics of thyroid hormone signaling group, Lyon, France*

[2]*Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), Paris, France*

[3]*Université Claude Bernard Lyon 1, ANSES, laboratoire de Lyon, France*

Abstract

Nanopesticides are innovative pesticides involving engineered nanomaterials in their formulation to increase the efficiency of plant protection products, while mitigating their environmental impact. Despite the predicted growth of the nanopesticide use, no data is available on their inhalation toxicity and the potential cocktail effects between their components. In particular, the neurodevelopmental toxicity caused by prenatal exposures might have long lasting consequences. In the present study, we repeatedly exposed gestating mice in a whole-body exposure chamber to three aerosols, involving the paraquat herbicide, nanoscaled titanium dioxide particles ($nTiO_2$), or a mixture of both. Particle number concentrations and total mass concentrations were followed to enable a metrological follow-up of the exposure sessions. Based on the aerosols characteristics, the alveolar deposited dose in mice was then estimated. RNA-seq was used to highlight dysregulations in the striatum of pups in response to the *in utero* exposure. Modifications in gene expression were identified at post-natal day 14, which might reflect neurodevelopmental alterations in this key brain area. The data suggest an alteration in the mitochondrial function following paraquat exposure, which is reminiscent of the pathological process leading to Parkinson disease. Markers of different cell lineages were dysregulated, showing effects which were not limited to dopaminergic neurons. Exposure to the $nTiO_2$ aerosol modulated the regulation of cytokines and neurotransmitters pathways, perhaps reflecting a minor neuroinflammation. No synergy was found between paraquat and $nTiO_2$. Instead, the neurodevelopmental effects were surprisingly lower than the one measured for each substance separately.

Keywords: Aerosol toxicology; Neurodevelopment; Paraquat; nano-TiO_2; Nanopesticides;

INTRODUCTION

In response to the growing worldwide demand for food, nanotechnology applications in agriculture elicit a particular interest, taking the form of innovative nanofertilizers and nanopesticides. This term mostly refers to either pesticides with nano-sized active substances or mixtures in which engineered nanomaterials (ENMs) are mixed with conventional active ingredients to control their transport, release, or degradation (Sun et al. 2019). ENMs are defined as intentionally produced products with any external dimension or an internal surface structure at the nanoscale, i.e., in the 1 - 100 nm size range (ISO/TS 80004-1:2015). Overall, nanopesticides may represent important technological innovations to address the sanitary and environmental drawbacks of pesticides, as they could decrease the required tonnages of active substances. More than 1000 patents linked with these technologies have already been granted in the past years (Melanie Kah, Tufenkji, et White 2019) and a rapid increase of nanopesticide use is expected (Gilbertson et al. 2020; Qazi et Dar 2020).

Several authors already emphasized the knowledge gap surrounding the sanitary impact of these emerging products (Agathokleous et al. 2020; M. Kah et al. 2018; Sun et al. 2019) and health agencies highlighted the necessity to assess the toxicological consequences of a deliberate release of ENMs in the environment (USDA, 2015). ENMs can cross the placenta (Bongaerts et al. 2020; Guillard et al. 2020) and the brain-blood barrier (Bencsik, Lestaevel, et Guseva Canu 2018; Boyes et van Thriel 2020; Ceña et Játiva 2018) and might thus alter the fetal brain development. Subcutaneous administration of $nTiO_2$ into gestating mice notably increases dopamine levels in the cortex and striatum of the offspring (Takahashi et al. 2010; Umezawa et al. 2012). Prenatal exposure to $nTiO_2$ also has long term consequences in rats, enhancing depressive-like behaviors at adult stage (Cui et al. 2014).

ENMs contained in nanopesticides might also exert adverse effects by potentiating the toxicity of pesticides. Although the current regulation enforces to assess the toxicity of both ENMs and pesticides, the novel properties arising from their combination is not carefully addressed in current test guidelines (Kookana et al. 2014). However, ENMs can modify the absorption, biodistribution and reactivity of associated chemicals (Naasz et al., 2018). Synergistic hepatotoxicity of a mixture of paraquat (PQ) and SiO_2 nanoparticles has already been reported in mice (Nishimori et al., 2009). Moreover, experimental data also support adverse effects of ENMs on neurodevelopment, namely because of the ability of ENMs to cross the placenta (Bongaerts et al. 2020; Guillard et al. 2020) and the brain-blood barrier (Bencsik, Lestaevel, et Guseva Canu 2018; Boyes et van Thriel 2020; Ceña et Játiva 2018). Thus, the nano-formulation of nanopesticides might potentiate the neurodevelopmental toxicity of pesticide active substances.

We address here the possible occurrence of synergistic effects induced by the prenatal exposure to aerosols involving a mixture of an active substance and an ENM. As a proof of principle, we associated PQ with TiO_2 P25 ($nTiO_2$), which is both an ENM suitable for agricultural applications (Y. Wang et al.

2016) and a reference toxicological nanomaterial extensively studied in the literature (Shi et al. 2013; X. Zhang, Li, et Yang 2015). We prioritized the developmental period because of its high sensitivity to environmental factors (Barouki et al. 2012) and because any adverse effect at this stage could have irreversible consequences. PQ was selected for its known neurotoxicity. Exposures of gestating mice (20 mg/kg/day) provoke irreversible neurobehavioral and cognitive deficits in the offspring (Ait-Bali, Ba-M'hamed, Bennis 2016). Human occupational exposure to PQ is also suspected to increase the occurrence of Parkinson Disease (Brouwer et al. 2017; Kamel et al. 2007; Moisan et al. 2015; Tanner et al. 2011; A. Wang et al. 2011). Although the association of PQ and P25 $nTiO_2$ has not been reported in the fields, it might be suitable for agriculture, as the $nTiO_2$ photocatalytic activity can degrade PQ under UV illumination (Florêncio et al. 2004; Nicosia et al. 2021). Their association could reduce the half-life of PQ in soils, which otherwise can reach several years (Sartori et Vidrio 2018). We chose to expose mice by inhalation, as it is a major route of occupational exposure to pesticides. Depending on the spraying conditions and the volatility of the pesticide formulation, 10-75% of the applied tonnages are unintentionally disseminated in the air (Pimentel 2005). As a result, low concentrations of pesticide residues can be detected in air samples of both rural and urban sites (Coscollà et al. 2013; Schummer et al. 2010). Nevertheless, to our knowledge the inhalation effects of nanopesticides have not yet been addressed despite the fact that inhalation could represents a main route of occupational and residential exposure. Therefore, it seems essential to assess their potential toxicity, namely on the nervous system which is known to be a specific target of nanosized toxics (Bencsik, Lestaevel, et Guseva Canu 2018). In this study, we used an ad hoc aerosol exposure chamber for rodents, which was previously characterized using a metrological protocol, to generate PQ, $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$ aerosols (Hamdaoui et al. 2021).

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

Experimentations were conducted according to the European regulation concerning the protection of animals dedicated to scientific purposes (European Directive 2010/63/EU). The protocol was approved by the local Ethics Committee (CECCAPP) and the French Ministry for Research and Higher Education (CECCAPP_ENS_2019_015). Two-month old primiparous C57Bl6/J mice (gestation day 4, GD4, purchased from Charles Rivers) were randomly assigned to hosting cages (2 females/cage) and housed in standard environmental conditions (humidity of 55 ± 10%; temperature 22 ± 2°C; 12/12 h light/dark cycle) at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (SFR BioSciences Gerland - Lyon Sud, France Accreditation N° D54-547-10). Animals had free access to water and a supplemented diet for pregnant mice (Safe 105 rodent pellets).

Groups of gestating mice were exposed to aerosols of either PQ (0.1 mg/m³), $nTiO_2$ (10 mg/m³) or PQ + $nTiO_2$ (10 mg/m³). These target concentrations were chosen to match the values of occupational exposures reported in the literature, in $nTiO_2$ production sites (5 mg/m³; particle size in the range of 15 – 710.5 nm) (Lee et al. 2011), and in PQ treated fields (0.12 mg/m³) (Morshed et al. 2010). One additional control group was kept in the same conditions during the duration of the exposure sessions, but without aerosol exposure. Each group of exposure was composed of 12 gestating mice exposed at the same time. Gestating mice were repeatedly exposed from GD6 to GD18 for 1.5 hour, 6 days/ week, for a total of 11 sessions of exposure, including an individual body weight follow-up. Male and female pups received a lethal intraperitoneal injection (6 mL/kg) at post-natal day 14 (PND14) of a mixture of Ketamine (33 mg/mL) and Xylazine (6.7 mg/mL). Blood was collected on ice in heparin tubes, then centrifuged (15 min at 2,500 g) and the supernatants were stored at −80°C. Organs were weighted and sampled, then stored at −80 °C for later analysis. The striatum was dissected and snap frozen in liquid nitrogen.

Aerosol exposures

The aerosols and the exposure chamber used in this study have been previously characterized (Hamdaoui et al., 2021). Briefly, the aerosol exposure chamber was composed of a rodent cage (Tecniplast GR900, internal volume of 19.8 L), used as a whole-body exposure chamber, coupled with a nebulizer (model 3076, TSI Inc.) to produce aerosols from colloidal suspensions. It was operated to generate three different aerosols i.e., $nTiO_2$ alone, PQ alone and $nTiO_2$ mixed with PQ (PQ + $nTiO_2$). Aerosols were produced from daily prepared colloidal suspensions with PQ dichloride hydrate (Sigma Aldrich reference 856177) in ultrapure water (MilliQ, Millipore, 18.2 MΩ.cm resistivity) and/or bulk powders of $nTiO_2$ (Sigma Aldrich reference 718467). All colloidal suspensions were constantly stirred during the nebulization process. The generated $nTiO_2$ aerosols were composed of nanostructured agglomerates and aggregates of $nTiO_2$ nano-objects. The stability of PQ concentration in suspension with $nTiO_2$ was assessed, to ensure that our experimental conditions did not cause its photocatalytic degradation during aerosol generations. The metrological characterization of this experimental set-up was previously described in terms of particle number size distribution, mass and number concentrations, spatial and temporal stability (Hamdaoui et al., 2021). The proper functioning of the device and the stability of aerosols were monitored during each animal exposure in real-time, by using a condensation particle counter (model 3007, TSI Inc.) to measure the particle number concentrations inside the exposure chamber. In addition, the mass concentrations of aerosols were also monitored by aerosol filtration using a 47 mm filter-holder (Pallflex® filters, EmfabTMTX40HI20-205 WW type) followed by gravimetric measurements. The chamber average concentrations did not deviate from the mean by more than ± 20%, in accordance to the test guidelines for inhalation toxicology (OECD, TG 412).

Estimation of the deposited particle mass in gestating mice

The deposition fractions of aerosols in gestating mice and human lungs were calculated using the Multiple Path Particle Dosimetry Model (MPPD version 3.04). Several estimations were necessary to determine the relation between mice model and human exposure by using the alveolar surface as weighting factor (Jarabek, Asgharian, et Miller 2005). The characteristics of aerosol previously described (Hamdaoui et al. 2021) were used to estimate the alveolar deposition fraction for each aerosol. According to the recommended exposure limit of the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) for ultrafine TiO_2 and PQ, 300 µg/m³ was used for $nTiO_2$ and 100 µg/m³ for PQ for the calculation in human. The target concentrations used in this study (10 mg for $nTiO_2$ and 100 µg/m³ for PQ) were chosen for mice, with a minute ventilation of 22.2 mL/min (Tankersley, Fitzgerald, et Kleeberger 1994) and an alveolar surface of 0.05 m² (Stone et al. 1992). A scenario of occupational exposure was chosen, involving a woman working for 8 months during pregnancy, with a nasal minute ventilation of 19 L/min, corresponding to workers achieving light duties (Winter-Sorkina et Cassee 2003), and a human alveolar surface of 102 m² (Stone et al. 1992). We assumed that this worker would be exposed 8 h per day, 5 days per week, 20 days per month using the Yeh/Schum symmetric lung model without clearance.

Plasmatic markers of inflammation

Systemic inflammation is known to play an important role in neurologic and neurodevelopmental impairments and inflammation is typically measured by quantifying circulating cytokines. Pups plasma were thawed and pooled by litters (n≥5/litter). Fifty microliters were assayed using an ELISA multiplexed kit (MCYTOMAG-70K-26, Bio-Techne) to measure the concentrations of 8 cytokines (MCP-1, Cxcl1, IL-1 beta, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-alpha) and the matrix metalloproteinase MMP12 on a Luminex platform (Luminex MAGPIX, ThermoFisher). These markers were selected for their implication in neurodevelopment (MCP-1, IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha) (Nist et Pickler 2019), their role as pro-inflammatory factors (IL-4, IL-10, IL-17 and Cxcl1), or in extracellular matrix remodeling (MMP12) following tissues insults. The gene *Mmp12* has already been described as an early marker of the lung insults in response to low concentrations of PQ in mice (Tomita et al. 2007).

RT-qPCR

Total RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen) from frozen striatum (n≥8/group). On column DNase digestion was used to remove contaminating DNA. RNA concentrations were measured with a Nanodrop spectrophotometer (ThermoScientific) and 1 µg of each RNA sample was reverse transcribed in murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega) and random DNA hexamer primers. Quantitative PCR was performed according to a standard protocol, using the Biorad iQ SYBRGreen kit and the Biorad CFX96 thermocycler. For each pair of primers (Supplementary data, Table S1) a standard curve was established to verify PCR efficiency (90%–110%) and quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak et Schmittgen 2001). We verified that the *Gapdh* and *Rplp0* housekeeping genes which were used as internal controls do not vary significantly in our samples according to RNA-seq. Differences among experimental groups were analyzed with the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test to compare mRNA relative mean levels using Prism (GraphPad 8.3 Software, Inc, San Diego CA).

RNA-seq analysis

Striatum RNA was extracted using the Macherey-Nagel NucleoSpin RNA II kit. cDNA libraries were prepared using the total RNA SENSE kit (Lexogen, Vienna Austria) and analyzed on an Nextseq500 sequencer (Illumina). Raw data of single-end sequencing (GSE169579) were converted to count tables using htseq-count (Galaxy Version 0.6.1galaxy3) (Anders, Pyl, et Huber 2015). Differential gene expression analysis was performed between exposure and control groups with Deseq2 (Galaxy Version 2.1.8.3, one-factor, parametric fit type, automatic outlier replacement and filtering, p-adjusted values <0.05; minimum read number >10) (Love et al. 2015). RNA-seq data are accessible through GEO Series accession number: **GSE143933** (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE169579#).

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Gene Set Enrichment Analysis (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp) was performed as previously described (Mooney et Wilmot 2015; Subramanian et al. 2005). Statistical significance was tested by empirical permutation followed by multiple hypotheses correction using Kolmogorov-Smirnov statistics (Subramanian et al. 2005; Tamayo et al. 2012). Several gene set databases were used: hallmark, C2 curated (KEGG, REACTOME) and C5 ontology (biological process) (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb). A p-value cut-off of p<0.01 and an FDR<0.05 were used to select the significant gene sets, and only a limited number was selected to avoid pathway redundancy. Gene sets

were filtered by size, for too specific sets (<15 genes) or too general sets (>300 genes) to compare the control group versus each exposed group, using 1000 random permutations of the gene sets for resampling. A network analysis was performed to highlight dysregulated pathways using the Cytoscape software (version 3.8.2) (Cline et al. 2007) with the Enrichment Map plug-in (Merico et al. 2010). The selected gene sets with a False Discovery Ratio <0.05 (FDR), were represented with edges linking gene sets showing an overlap >30% and then clustered in function of their common biological functions.

RESULTS

Experimental design

We exposed 3 groups of gestating mice from the inbred C57/Bl6J strain, which has a well-defined genetic background, to aerosols containing low concentration of either PQ (0.1 mg/m³), $nTiO_2$ (10 mg/m³) or PQ + $nTiO_2$ (10 mg/m³). These concentrations were selected for their relevance to human exposure (see methods for estimations). Aerosols exposure sessions were started at GD6, before the beginning of neurulation, to ensure a continuous exposure during the entire neurodevelopment. The last session was at GD18, i.e., 1.5 day before birth, to limit maternal stress during the perinatal period.

Pups were kept with their mother until PND14, a stage at which the main neurodevelopmental processes are completed. We then used an unbiased transcriptome analysis of gene expression of the post-natal striatum to highlight possible dysregulations caused by *in utero* exposures, and a possible cocktail effect. Following a previous study (Gollamudi et al. 2012), we selected this brain area for several reasons. It first represents a relatively homogenous and well delimitated brain area, where 95% of the neurons are GABAergic medium spiny neurons, known to be highly sensitive to moderate neurodevelopmental alterations (Richard et al. 2020). In addition, striatum neurons receive dopaminergic innervation from *subtantia nigra*, one of the main sites of the PQ neurotoxicity. Thus, we expected that the striatum gene expression could represent a sensitive endpoint to early neurodevelopmental insults.

Aerosol exposures and dosimetry assessment

The particle number concentrations assessed in real-time within the exposure chamber were stable over the duration of exposures for the three aerosols (Figure 1) and the results of particle number and mass concentrations are reported in Table 1. The average number concentrations did not deviate from the mean by more than 9% and the mass concentrations matched the desired target concentrations with a maximum relative standard deviation of 8%.

The alveolar deposition fraction in gestating mice and human beings were calculated using the MPPD model to assess the alveolar deposited mass in each species (Supplementary data, Table S2). For $nTiO_2$ and PQ, they were respectively 384 µg/m² and 229 µg/m² in human beings, and 298 µg/m² and 9 µg/m² in mice. Therefore, mice exposures during gestation resulted in an alveolar particle deposition below what a pregnant worker could theoretically be exposed to, if working during eight months at levels of exposure corresponding to the occupational exposure limit. The deposition fraction of the aerosol of PQ + $nTiO_2$ was estimated in a similar manner. Due to similar aerosol characteristics in terms of size distribution, no significant difference was found in its alveolar deposition in comparison with $nTiO_2$ alone in human being or mice. The mixture resulted in interactions between PQ and $nTiO_2$ particles in the aerosol phase, but the MMPD modelling cannot deconvolute the deposited mass attributable to each substance separately. Therefore, we were not able to decipher the deposition fraction in each substance (PQ versus $nTiO_2$) in the aerosol of PQ + $nTiO_2$.

General health endpoints of exposed females and litters

The treated mice did not display any obvious sign of discomfort. Statistical analysis did not evidence any significant effect of aerosol exposure on gestating mice weight gain, offspring survival, and litter body weights at different post-natal stages (Supplementary data, Figure S1). In addition, prenatal aerosol exposures did not have any incidence on the characteristics of litters (number, sex ratio) or organ weight at PND14 (Supplementary data, Table S3). Only two markers were detected in the plasma of pups (MMP12 and Cxcl1) (Figure 2). Cxcl1 chemokine was found to be slightly but significantly increased in the PQ group of exposure in comparison to the control group, which is an indication of a slight systemic inflammation in this group.

Assessing neurodevelopmental effects by transcriptome analysis

RNA was extracted from the striatum of pups at PND14. We first used RT-qPCR to address the possible accidental presence of neighboring neural tissues in the striatum samples. The expression of *Drd2* and *Adora2a*, whose expression is restricted to striatum, and *Fezf1* which is selectively expressed in the neighboring cortex, was homogeneous. Sixteen striatum samples (4/group, 50% males and 50% females) coming from sixteen different litters were selected for RNA-seq analysis. Deseq2 was then used to identify differentially expressed genes (DEGs) in each group of exposure in comparison to the control group. The Principal Component Analysis (PCA) of the total normalized counts (Figure 3A) highlighted different profiles for the different groups. The first principal component, explaining 37% of the variation mainly reflected the groups exposure. The second principal component, explaining 26% of

the variation, mainly reflected the distinction between females and males. However, intragroup comparison between males and females did not evidence different response to aerosol exposures. Because of a hypothalamic contamination during dissection, one outlier coming from the PQ group was detected thanks to Deseq2 and excluded from the analysis.

Both PQ and $nTiO_2$ aerosols had a clear influence on gene expression. The number of differentially expressed genes (DEGs) was 2038 for PQ, 1249 for $nTiO_2$, and only 287 for PQ + $nTiO_2$. Up-regulation was more frequent that down-regulation (Figure 3B) as up-regulated genes represented 59%, 89% and 85% of the total number of DEGs for PQ, $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$, and the fold-changes exceeded 1.5 for 120, 61 and 36 DEGs respectively. The overlapping DEGs between the three groups of exposure reached 170 (Figure 3C), suggesting that some similarities between the mode of action of PQ and $nTiO_2$. A smaller subset of 18 DEGs were upregulated in the three groups of exposure, with a fold-change superior to 1.5. In agreement with the previous global analysis, the combined exposure to PQ + $nTiO_2$ had globally a lesser influence on these 18 genes (Figure 3D).

RT-qPCR was used to confirm some of the RNA-seq observations on a larger number of animals for 8 genes selected for their known role in neurodevelopment (Figure 4). These genes were markers of neuronal differentiation (*Nefl*, *Nefh*) (Hogberg et al., 2009), reactive astrogliosis resulting from neurological insults (*Gfap*) (Eng et Ghirnikar 1994), myelination (*Fa2h*, *Mobp*) (Potter et al., 2011; Royland et al., 2008), GABAergic neurons maturation (*Kcnc2*) (Fukumoto et al., 2018) and microglial activation (*Chga*) (Ciesielski-Treska et al., 1998). *Bdnf* encodes a neutrophin, which is essential for the neuron survival, growth and differentiation, whose modification has been associated with mental disorders (Ikegame et al. 2013). The expression of *Nefl* and *Nefh*, which encode filament proteins expressed respectively during early and late neuronal maturation, were both found dysregulated in the PQ group, while only *Nefl* was found dysregulated in the PQ + $nTiO_2$ group. Interestingly, the expression of the *Chga* gene was overexpressed in all exposure groups with the same amplitude. Moreover, *Kcnc2* which is highly expressed in the medium spiny neurons of striatum was clearly upregulated in the PQ and PQ + $nTiO_2$ groups. The expressions of *Gfap* and myelin-forming markers (*Fa2h* and *Mobp*) were upregulated solely in the PQ group. Overall, the dysregulation of these genes, with the possible exception of *Bdnf*, was more pronounced in the PQ group, supporting the observations coming from RNA-seq data.

Interpretation of transcriptome changes - Gene Set Enrichment Analysis

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) can identify differential expression of gene sets, when the expression difference between genes is minimal and cannot be evidence by classical methods on a single gene basis. GSEA was used to interpret the broad but often modest changes in gene expression revealed

by RNA-seq, to identify relevant biological pathways. Overall, 77 gene sets were found dysregulated in the striatum of the three groups of exposure (Supplementary data, Table S4 and Figure S2).

PQ exposure resulted in the up-regulation of 7 gene sets involved in gliogenesis and axon ensheathment, and 4 gene sets associated with neuron projection and axon guidance (Figure 5A). This suggested an alteration in the timing of differentiation for both oligodendrocytes and the main neuronal cell type, the medium spiny neurons. Among the five identified pathways which were down-regulated, two were likely to reflect a possible direct effect and persisting of PQ in the post-natal brain, following fetal contamination, as they are known to be involved in the etiology of the PD. These are related to redox homeostasis (1 gene set) and mitochondrial electron transport (8 genes sets), which may be linked to PQ oxidant properties. The subset of genes accounting for the enrichment of this pathway, the leading-edge genes according to GSEA results, was analyzed using ClueGO (version 2.5.7, [Bindea et al. 2009]) from the Cytoscape package in order to visualize the deregulated pathways in a functionally grouped gene network. A focus presenting the 53 leading edge genes of the Parkinson disease gene set (KEGG, total of 110 genes) is presented in Figure 5B, showing that 32 of them were specifically related to the oxidative phosphorylation pathway. In addition, the gene set associated with the cell redox homeostasis (total of 52 genes) encompassed 24 leading edge genes. Within this set, 18 genes were related to the oxidoreductase activity, involving for example the Glutathione reductase (*Gsr*), which is necessary to maintain high levels of reduced glutathione in the cytosol (Yang, Chan, et Yu 2006).

The consequences of gestational exposure to $nTiO_2$ were also highlighted (Figure 6A), with only one down-regulated pathway (centromere complex assembly, 2 gene sets), and 4 up-regulated pathways. These pathways were related to gliogenesis, axon ensheathment and guidance (5 gene sets). This is an indication that $nTiO_2$ also may have adverse effects on oligodendrocytes differentiation and neuronal maturation. The identification of the ion homeostasis pathway (5 gene sets) also suggested an alteration of the neuronal electrophysiology. The appearance of the pathway “Chemokines production and B-Cell proliferation” pointed out a potential low grade neuroinflammation. Finally, $nTiO_2$ exposure also altered the “regulation of neurotransmitters” pathway (11 gene sets).

The gestational exposure to the combination of PQ + $nTiO_2$ had a visible influence on only 3 pathways (Figure 6A) which is consistent with its decreased influence on the gene expression. These pathways are: “regulation of neurotransmitters” (12 gene sets), “neurons and dendrites extension” (2 gene sets) and “voltage potassium channels” (4 gene sets). As the regulation of neurotransmitters was commonly found upregulated only in the $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$ groups, the dysregulation of genes involved in neurotransmitters release is probably caused by $nTiO_2$, independently of PQ. The first 50 leading edge genes accounting for the enrichment of this pathway were represented using ClueGO (Figure 6B). These common genes accounting for the enrichment of this pathway and their associated fold-changes were represented on a radar plot for the $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$ groups, showing a similar

influence of both exposures (Figure 6C). This illustrates that PQ + $nTiO_2$ did not have an additive effect on this pathway, which is dysregulated by both $nTiO_2$ and the mixture. Interestingly, two genes related to the glutamate neurotransmission were highlighted: the Glutamate receptor (*Grina3*) and the Metabotropic glutamate receptor 4 (*Grm4*). The α-synuclein gene (*Snca*) was also found in the leading edge set of this pathway and different trends were observed, as a slight decrease was found after exposure to PQ (Fold-change=0.80, adjusted p-value=0.01) and $nTiO_2$ (Fold-change=0.82, adjusted p-value=0.02), but not to PQ + $nTiO_2$.

DISCUSSION

Effect of maternal exposure to aerosols

We present novel evidence showing that prenatal exposures to aerosols of PQ and/or $nTiO_2$ at low concentrations, which are theoretically considered safe, have a significant effect on the gene expression in the developing brain. The calculation of the deposition fractions for each aerosol using dosimetry modeling allowed an interspecies extrapolation. We could identify some consequences of the *in utero* exposure by analyzing the gene expression in the post-natal striatum. In this context, transcriptome analysis proved to be an unbiased, powerful and sensitive method to detect neurodevelopmental alterations.

Paraquat neurodevelopmental toxicity

Despite a very low deposition of PQ in maternal lungs, clear changes in gene expression were observed in the striatum of pups after birth, irrespective of their gender, which reflect alterations in different cell lineages. The observed changes suggest moderate defects in neuronal maturation and oligodendrocytes differentiation. They are also indicative of inflammation, with astrogliosis and microglial cells activation. Therefore, the influence of PQ in the developing striatum is not limited to dopaminergic neurons and we propose that it combines direct and indirect effects on neural cells. Based on previous toxicological knowledge and our observations, PQ may directly alter the mitochondrial function and the redox status in neurons, during fetal and early post-natal life, as it does in adult brain to induce Parkinson disease (Jomova et al. 2010). Some of the highlighted changes in gene expression are possibly involved in this process: Glutathione reductase (encoded by the *Gsr* gene) is necessary to maintain high levels of reduced glutathione in the cytosol (Yang, Chan, et Yu 2006), Selenoprotein (product of the *Selenot* gene) protects dopaminergic neurons against oxidative stress in mouse models of Parkinson disease (Boukhzar et al., 2016), Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase (*Prkn*), and α-synuclein (*Snca*) maintain the dopamine neuronal homeostasis, whose dysfunction is related to the onset

of Parkinson disease (Kuroda et al. 2012; Oczkowska et al. 2013). These initial mitochondrial alterations may indirectly influence the maturation of the neuronal networks, the post-natal myelination process, and eventually favor neuroinflammation. Taken together, these observations suggest that PQ alters mitochondrial functions in the striatum of exposed pups in a way that is reminiscent of the pathological process leading to Parkinson disease.

This interpretation is consistent with the study of Gollamudi et al. (2012), in which the striatum transcriptome was analyzed after the acute exposure of adult mice to PQ. This also caused dysregulations of the signaling pathways related to Parkinson disease. Exposure of gestating mice to a high dose of PQ via the oral route (Ait-Bali et al., 2016) also induced various neurological and behavioral alterations in the offspring. In a recent study, adult C57Bl/6J mice were exposed to PQ aerosols (Anderson et al. 2020), leading to a significant PQ burden in different brain regions, including the striatum, associated with a male-specific deficit in olfaction, which is part of the prodromal features of Parkinson disease.

The amplitude of the observed changes is modest but does not rule out unforeseen latter consequences, as early alterations can exacerbate the sensitivity to additional stressors at adult stage (Barouki et al. 2012). Mittra et al. (2020) demonstrated that early exposure to PQ + Zn in rats affected the oxidative stress, inflammation, cell death, dopamine metabolism and storage regulating machineries. Therefore, re-exposure of adult rats caused more pronounced changes in all the observed endpoints of toxicity, compared with rat exposed only during adulthood, thereby showing that early insults emphasized the toxicity of secondary exposures. Similar conclusions were drawn for the early exposure to PQ combined with maneb (Colle et al. 2020).

$nTiO_2$ neurodevelopmental toxicity

The neurotoxicity of $nTiO_2$ was previously addressed at higher concentrations than those used here. Subcutaneous injection of large quantities of $nTiO_2$ to gestating mice induces a mitochondrial respiration dysfunction in the pups brain (Hathaway et al. 2017) altering the gene expression in the post-natal striatum of pups (Umezawa et al. 2012) and having long term consequences on their cognitive functions (Engler-Chiurazzi et al. 2016). Prenatal exposure to $nTiO_2$ aerosols also results in maternal and fetal microvascular dysfunction (Stapleton et al. 2015) and affects the production of neurotransmitters (Shimizu et al. 2009). Our results confirm that gestational exposure to $nTiO_2$ has adverse effect on striatum maturation, at a concentration which is much lower than those used in previous studies. Changes in gene expression suggest a modulation of neuronal maturation, neurotransmitter production, post-natal myelination, and possibly a low-grade neuro-inflammation. The convergence of our conclusions with previous studies suggests that the observed changes are neither transient nor adaptative but rather reflects moderate adverse effects on the brain maturation. The possibility that exposure to

aerosols containing realistic concentrations of $nTiO_2$ could compromise the neurodevelopment should thus be a matter of concern when considering their extensive use.

Interaction between $nTiO_2$ and PQ exposure.

We did not observe a synergistic nor an additive effect when combining PQ and $nTiO_2$. Instead, their association in aerosol phase seemed to lessen the effect of each substance. RNA-seq and RT-qPCR showed that the number of differentially expressed genes and the amplitude of the changes in gene expression were globally lower compared to pups exposed to either PQ or $nTiO_2$ solely. Moreover, unlike the PQ group, the concentration of the Cxcl1 inflammation marker was not increased in the pups plasma. The reduction of the mixture effect is not due to the PQ degradation by $nTiO_2$, as verified previously (Hamdaoui et al. 2021), but might reflect interactions between PQ and $nTiO_2$ particles. The aerosols of $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$ presented very similar particle size distributions, and the mixture displayed number concentrations that did not correspond to the sum of the reported concentrations for PQ and $nTiO_2$ taken separately. These elements suggest that mixing these substances prior to the aerosol generation does not produce two distinct populations of particles, but rather a composite population of particles associating PQ and $nTiO_2$. As PQ can be adsorbed on $nTiO_2$ in suspension (Florêncio et al. 2004; Phuinthiang et Kajitvichyanukul 2018; Vohra et Tanaka 2003; L. Zhang, A, et Xe 1994), these interactions are likely to occur during the nebulization process and in the aerosol phase. We hypothesize that this sorption changes the deposition fraction, biodistribution and particle toxicokinetics in a way which remains to be addressed. While PQ is suspected to cross the placental barrier (Ingebrigtsen, Nafstad, et Andersen 1984; Salama, Bakry, et Abou-Donia 1993), sorption to $nTiO_2$ might prevent this translocation. It has been shown previously that $nTiO_2$ caused a retention of the Cd^{2+} ions, thereby decreasing their bioavailability and preventing ecotoxicological effects. Eventually, $nTiO_2$ might have the same effect on the PQ toxic forms (PQ^{2+}/PQ^{+}), by decreasing its bioavailability and therefore its toxicity.

Limitations of the present study

We generated ultrafine PQ particles that do not strictly correspond to the primary size of sprayed pesticide particles in agriculture, which are rather coarse particles (>10 µm) mostly considered as not inhalable (Chester et Ward 1984). Nevertheless, according to its long environmental remanence and the wind erosion of soil particles containing PQ, occupational or residential populations can be exposed to inhalable PQ particles. This is in line with the results of Coscollà et al. (2013), who characterized the airborne residue of some pesticides mostly within the size range of 0.1 - 1 µm, showing that secondary

exposure to pesticide residues encompass particles that may be deposited in the airways after their atmospheric transport.

We studied the consequences of gestational exposures to PQ and $nTiO_2$ aerosols at a single time-point in the striatum, which does not allow to address the reversibility of the observed changes. Also, in the absence of complementary histological, biochemical and behavioral analysis, the interpretation of these changes remains hypothetical. Finally, further work would be needed to clarify the mechanisms by which the combination of PQ and $nTiO_2$ seems to lower their inhalation effects, and whether this conclusion would also apply to other cocktails of substances potentially suitable for the nanopesticide formulations.

CONCLUSIONS

This study demonstrates the pertinence to use an aerosol exposure chamber and RNA-seq analysis to better evaluate the unknown effects of low and repeated exposures to nanopesticide aerosols on neurodevelopment. Considering the growing demand for these innovative products and the lack of precise guidelines surrounding their health risk assessment, these results should reinforce awareness about their future sanitary impact. Taken together, these data also suggest that the risk associated with the exposure of aerosols containing PQ or $nTiO_2$ during critical stages, like pregnancy and early development, may have been previously underestimated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Benjamin Gillet and Sandrine Hughes from the IGFL-PSI facility for deep sequencing, and the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (SFR Biosciences UAR3444) for mouse breeding. This work was carried out as part of a thesis supported by a CIFRE fellowship involving the collaboration of the LNE and the École Normale Supérieure de Lyon (ENS de Lyon), by the ANSES (Thyrogenox program, PNRPE Ecophyto II) and the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement N°825753 (ERGO).

DISCLAIMER

The authors declare no conflicts of interest.

FIGURES

Table 1. Aerosol characteristics

Aerosol	**PQ**	**$nTiO_2$**	**PQ + $nTiO_2$**
Mass concentration (mg/m³)	*[98.7 ± 3.2] × 10^{-3}	10.1 ± 0.6	9.9 ± 0.8
Number concentration [× 10^3 particles/cm³]	249 ± 17	202 ± 17	308 ± 27
*Particle median diameter (nm)	50 ± 1	220 ± 7	173 ± 2
*Geometric standard deviation (GSD)	1.74 ± 0.01	2.10 ± 0.03	2.29 ± 0.02

* Assessed during the prior aerosol metrological characterization

Data presented as means ± standard deviation (SD). Mass and number concentrations were measured during the animal exposure sessions, except for PQ mass concentration that came from the prior aerosol metrological characterization along with count median particle diameters and geometric SD.

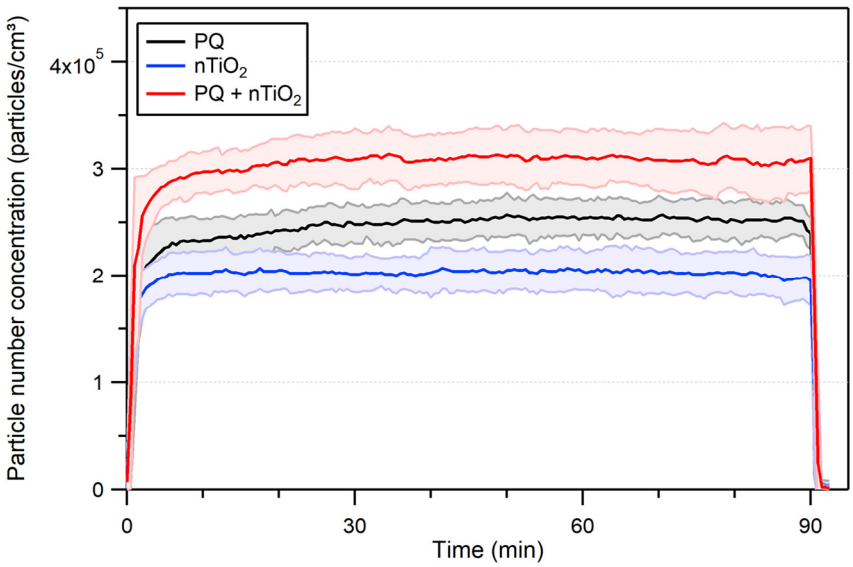


Figure 1. Real time measurement of aerosol particle number concentrations in the chamber during animal exposures, data presented as means ± standard deviation (SD) for each aerosol.

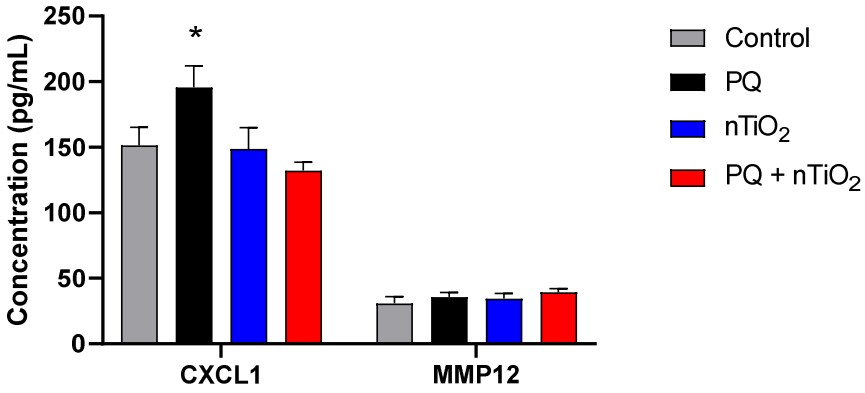


Figure 2. Plasmatic markers of inflammation in pups (PND14) exposed *in utero*. One out of 8 assessed cytokines were detectable by ELISA. No changes were detected in the MMP12 expression in any of the exposure groups. PQ exposures caused a significant increase in Cxcl1 in comparison to the control group ($n \geq 5$/litter, * p-value <0.05), thereby suggesting a low grade inflammation. Comparisons between groups were performed with the Kruskal-Wallis test (nonparametric test), followed by multiple mean comparisons with Dunn's test. Data presented as means ± SEM.

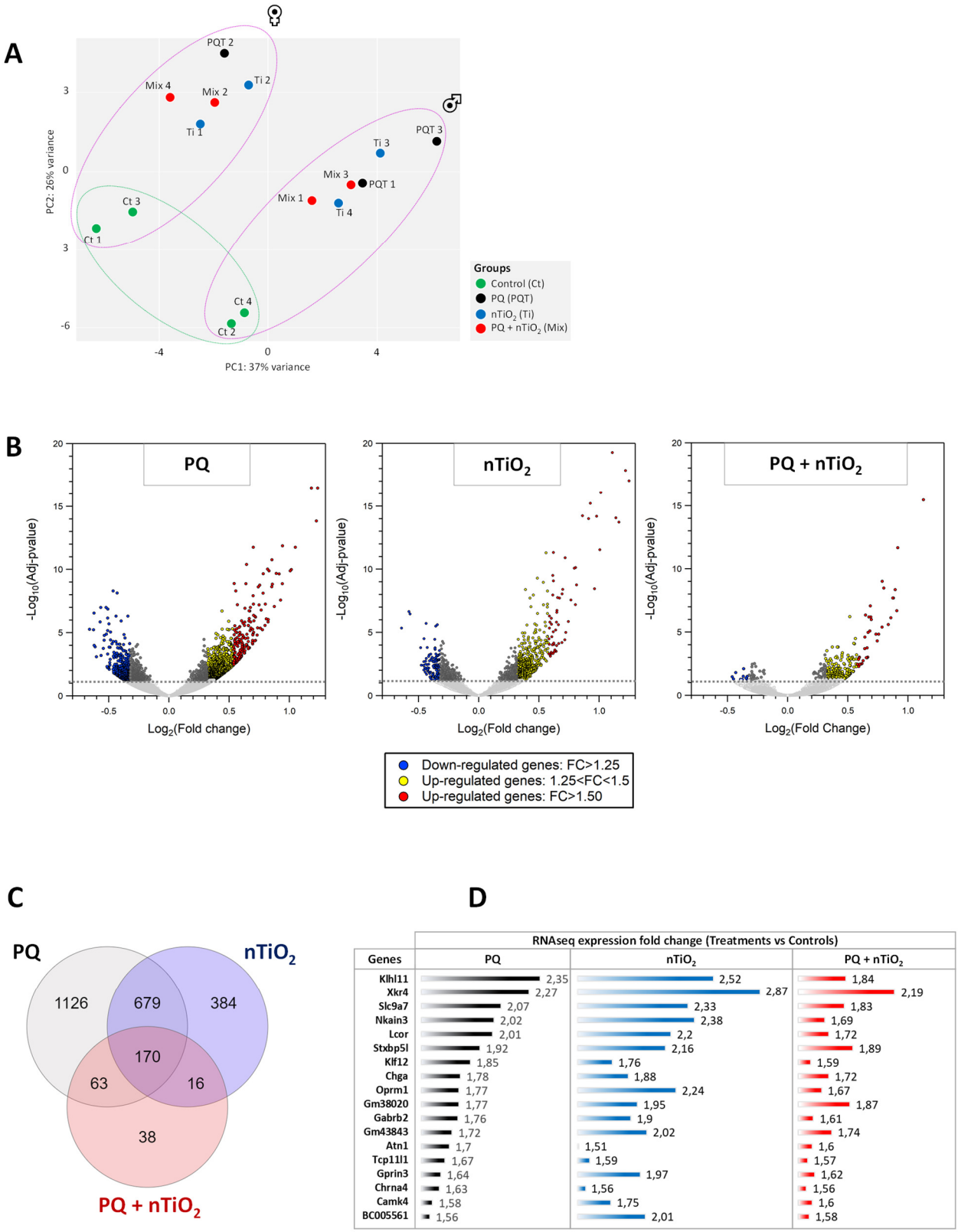


Figure 3. Transcriptome analysis of pups striatum. (A) PCA of the gene expression in 15 pups. (B) Volcano plots summarizing the comparisons between the groups of exposure versus the control group. (C) Venn diagram showing the overlap between DEGs for the 3 exposed groups (adjusted p-value <0.05; no threshold on fold-change), a main part of genes is associated with the PQ exposure only, $nTiO_2$ shared 68% of its DEGs with PQ, PQ + nTiO2 shared 81% with PQ and 65% with $nTiO_2$. (E) Fold-changes of the 18 DEGs up-regulated in the 3 groups with a fold-change >1.5; note that the response to the PQ + $nTiO_2$ is always equal or lower that the response to the individual substances.

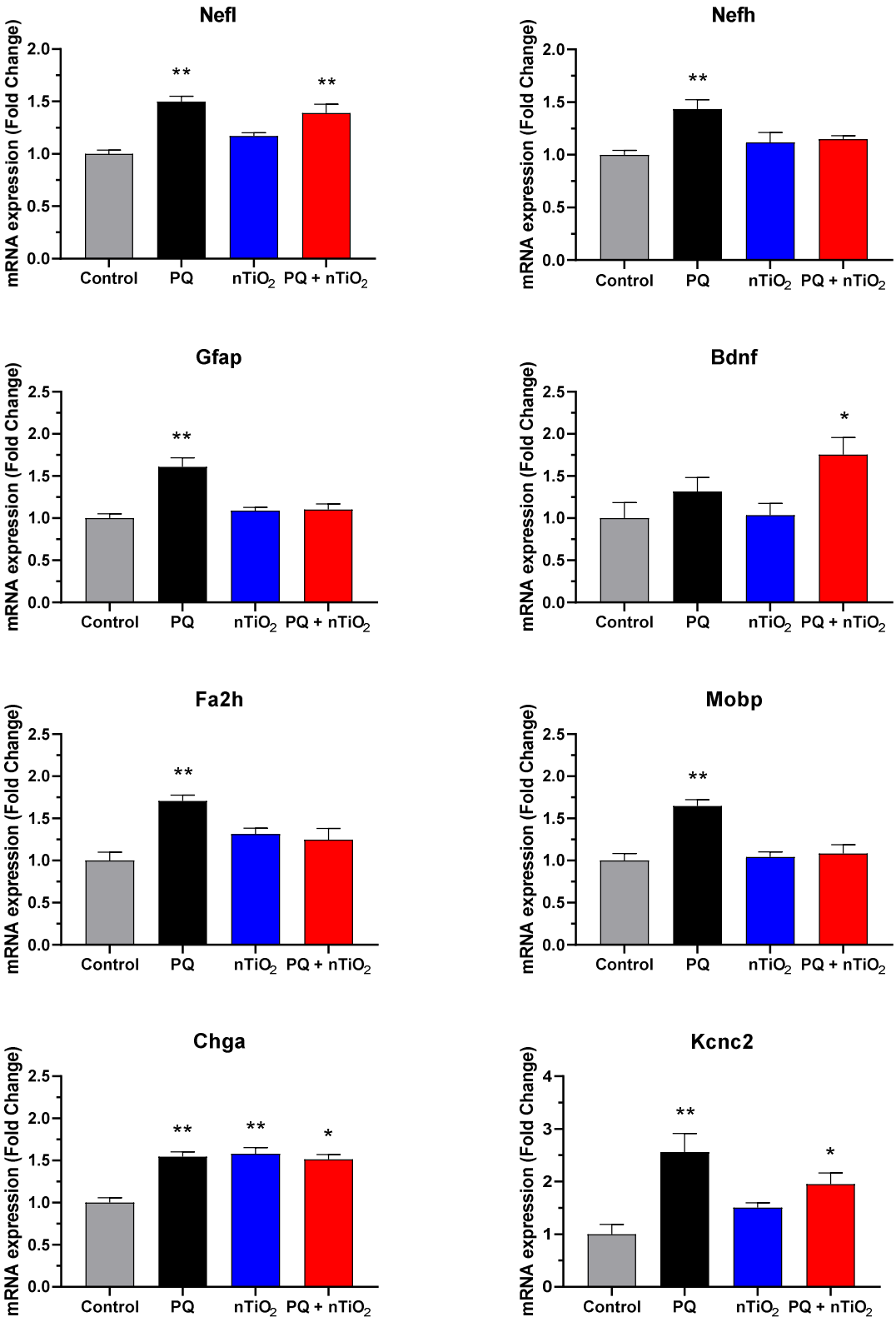


Figure 4. RT-qPCR relative gene expression to controls, analysis on pups striatum at PND14 ($N \geq 8$ for each group, 50% females and 50% males coming from at least 4 different litters). Comparisons between groups were performed with Kruskal-Wallis (nonparametric test), followed by multiple mean comparisons with Dunn's test. * $p<0.05$ ** $p<0.01$. Data presented as means ± SEM.

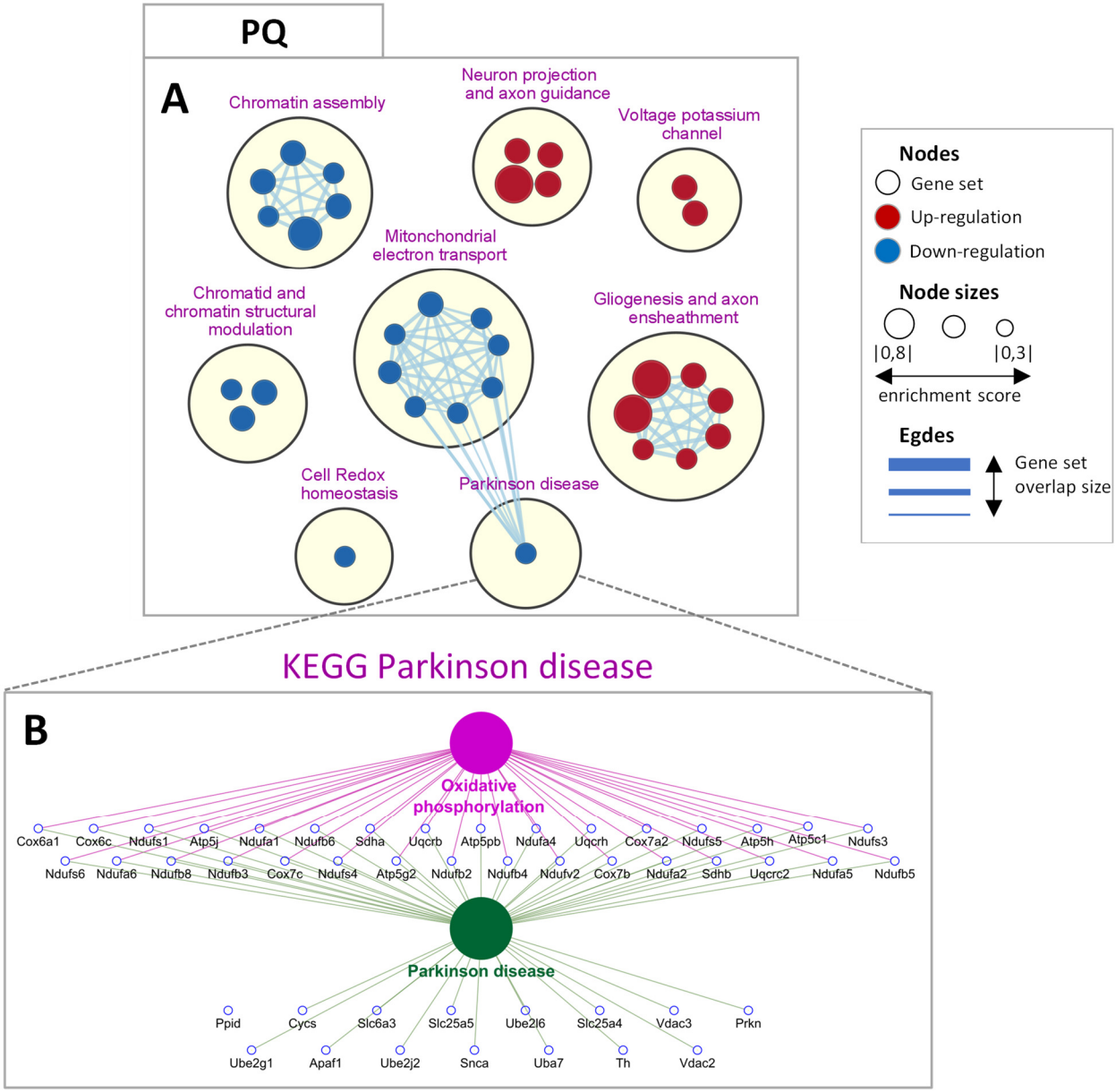


Figure 5. Gene Set Enrichment Analysis of striatum gene expression profiles in the PQ exposure group, analysis made using three MSigDB genes collections: Gene Ontology (GO) Biological Process ontology and two Canonical Pathways gene sets derived from the KEGG pathway database and from the Reactome pathway database. Each node represents a gene set significantly enriched in comparison with controls. The detailed gene set corresponding to each node, can be found in supplementary data, **Figure S2A**. Nodes are clustered in pathways based on their shared genes and their common biological functions. Edges are filtered with an overlap cutoff: the minimum edge between two nodes depict that 35% of one gene set is common with the other. (B) ClueGO analysis of the leading-edge gene set associated with KEGG Parkinson disease in the PQ group, represented to highlight the main biological function associated with those, notably the oxidative phosphorylation.

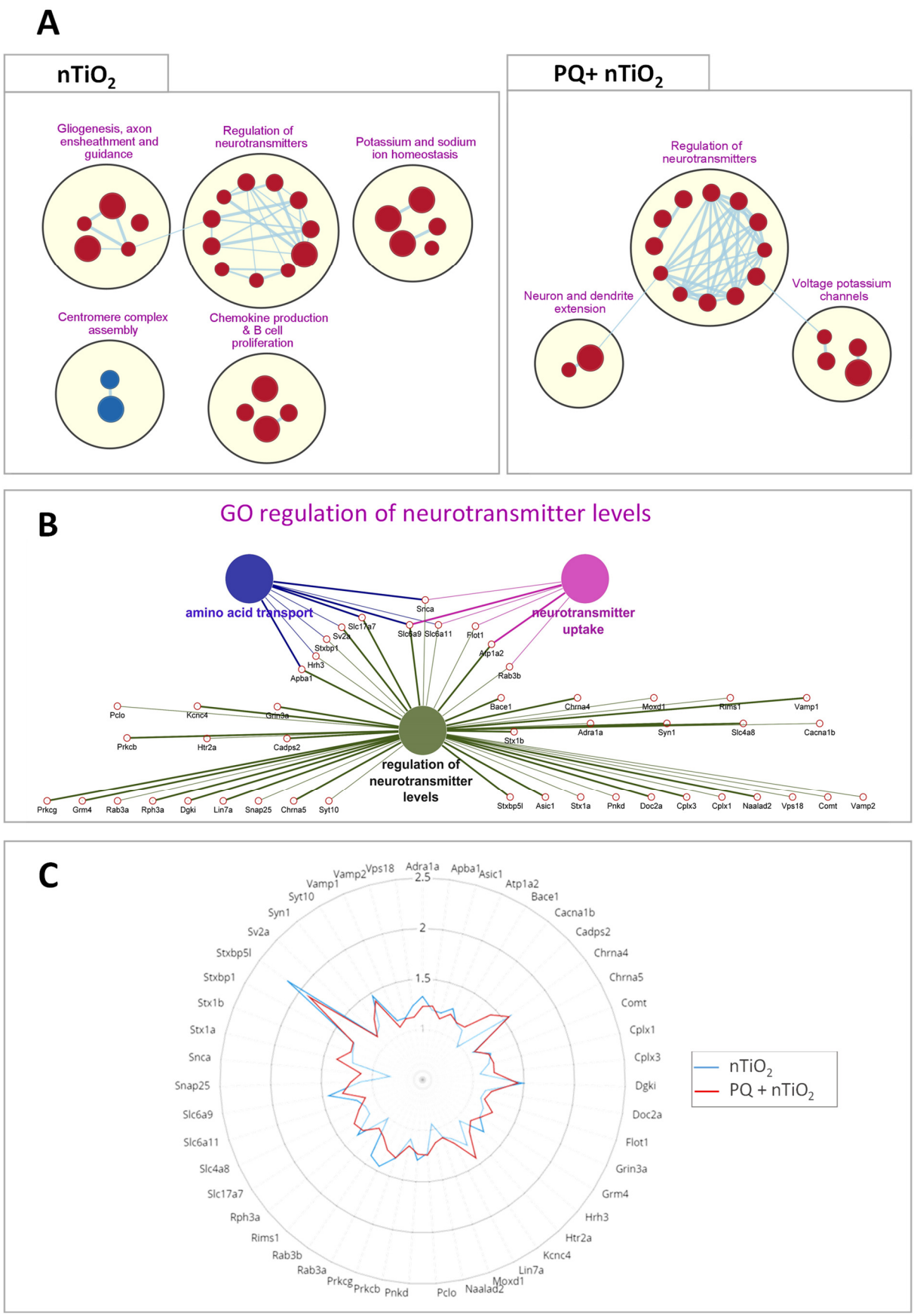

A
nTiO2
Gliogenesis, axon ensheathment and guidance
Regulation of neurotransmitters
Potassium and sodium ion homeostasis
Centromere complex assembly
Chemokine production & B cell proliferation
PQ+ nTiO2
Regulation of neurotransmitters
Neuron and dendrite extension
Voltage potassium channels
B
GO regulation of neurotransmitter levels
amino acid transport
neurotransmitter uptake
regulation of neurotransmitter levels
Snca
Slc17a7
Sv2a
Stxbp1
Hrh3
Apba1
Slc6a9
Slc6a11
Flot1
Atp1a2
Rab3b
Pclo
Kcnc4
Grin3a
Prkcb
Htr2a
Cadps2
Bace1
Chrna4
Moxd1
Rims1
Vamp1
Adra1a
Syn1
Slc4a8
Cacna1b
Stx1b
Prkcg
Grm4
Rab3a
Rph3a
Dgki
Lin7a
Snap25
Chrna5
Syt10
Stxbp5l
Asic1
Stx1a
Pnkd
Doc2a
Cplx3
Cplx1
Naalad2
Vps18
Comt
Vamp2
C
Adra1a
Apba1
Asic1
Atp1a2
Bace1
Cacna1b
Cadps2
Chrna4
Chrna5
Comt
Cplx1
Cplx3
Dgki
Doc2a
Flot1
Grin3a
Grm4
Hrh3
Htr2a
Kcnc4
Lin7a
Moxd1
Naalad2
Pclo
Pnkd
Prkcb
Prkcg
Rab3a
Rab3b
Rims1
Rph3a
Slc17a7
Slc4a8
Slc6a11
Slc6a9
Snap25
Snca
Stx1a
Stx1b
Stxbp1
Stxbp5l
Sv2a
Syn1
Syt10
Vamp1
Vamp2
Vps18
2.5
2
1.5
1
nTiO2
PQ + nTiO2

Figure 6. Gene Set Enrichment Analysis of striatum gene expression profiles in the $nTiO_2$ and PQ + $nTiO_2$ exposure groups (A), analysis made using three MSigDB genes collections: Gene Ontology (GO) Biological Process ontology and two Canonical Pathways gene sets derived from the KEGG pathway database and from the Reactome pathway database. Each node represents a gene set significantly enriched in comparison with controls. The detailed gene set corresponding to each node, can be found in supplementary data, **Figure S2B** ($nTiO_2$) and **S2C** (PQ + $nTiO_2$). Nodes are clustered in pathways based on their shared genes and their common biological functions. Edges are filtered with an overlap cutoff: the minimum edge between two nodes depict that 35% of one gene set is common with the other. (B) ClueGO analysis of the leading-edge gene set associated with the GO regulation of neurotransmitter levels in the $nTiO_2$ and PQ+$nTiO_2$ groups associated with their fold-changes for each gene in both treatments groups (C) represented on a radar plot.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Sequences of oligonucleotides for RT-qPCR

GENE	ACCESSION NUMBER GENBANK	PRIMER SEQUENCE (5'➔ 3'): Forward Backward
Nefl	NM_010910.1	CGCCATGCAGGACACAATCAAC GCTGCAATCTCGATGTCCAAGG
Nefh	NM_010904.3	GGAGTGGTTCCGAGTGAGGTTG TGCCGCCGGTACTCAGTTATC
Gfap	NM_001131020.1	GTGGAGAGGGACAACTTTGCAC TCCAAATCCACACGAGCCAG
Bdnf	NM_001048139.1	CCAGGTGAGAAGAGTGATGACC CTCGCTAATACTGTCACACACG
Fa2h	NM_178086.3	TACCTGCACTTCGGCTCTCC GCTGATGCCAAACCCTGATTTC
Mobp	NM_001039364.2	GTGCCTGCCAGAAGACTAGATTG GTTGCGGGAAGCAGTGAGTC
Chga	NM_007693.2	GTGCGCCGGGCAAGTTTTTG TTGGACAGCGAGTCGGAGATG
Kcnc2	NM_001025581.1	TACCTGCACTTCGGCTCTCC GCTGATGCCAAACCCTGATTTC
Drd2	NM_010077.2	ACCTGTCCTGGTACGATGATG GCATGGCATAGTAGTTGTAGTGG
Adora2a	NM_001331095.1	GCTGGTTTCGAAGTCGCCTG AGGGTTCTGAGATACCTGCCTC
Fezf1	NM_028462.1	GTCACCGGCCACTTCTAAAAC GTCTGCCTCTAACGCAGCA
Gapdh	NM_001289726.1	GGGTCCCAGCTTAGGTTCATC TACGGCCAAATCCGTTCACA
M36b4	NM_007475.5	CCCACCTTGTCTCCAGTCTTT ACCTCCTTCTTCCAGGCTT

Table S2. Pulmonary exposure calculations

	$nTiO_2$		PQ	
	Mouse	Human	Mouse	Human
Target mass concentration (µg/mL)	1.10^{-2}	3.10^{-4}	1.10^{-4}	1.10^{-4}
Duration of exposure (min)	990	76800	990	76800
Alveolar deposit fraction (%)	6.8	9.0	20.0	16.0
Ventilation (mL/min)	22.20	19000	22.20	19000
Alveolar surface (m²)	0.05	102	0.05	102
Lung burden	15 µg	39 mg	0.44 µg	23 mg
Alveolar deposited mass (µg/m²)	298	384	9	229
Total deposited mass (/kg of body weight)	4.2 mg	2.8 mg	38 µg	611 µg

The deposition fractions of aerosols in gestating mice and human lungs were calculated using the Multiple Path Particle Dosimetry Model (version 3.04). Several estimations were necessary to determine the relation between mice model and human exposure by using the alveolar surface as weighting factor (Jarabek, Asgharian, et Miller 2005). Following the Recommended Exposure Limit of the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) for ultrafine TiO_2 and PQ, 300 µg/m³ was used for $nTiO_2$ and 100 µg/m³ for PQ for the calculation in human. The target concentrations used in this study (10 mg for $nTiO_2$ and 100 µg/m³ for PQ) were chosen for mice. The assessment of aerosol count median diameters and geometric standard deviation (GSD) were used to estimate via MPPD the alveolar deposit fraction for each aerosol. Based on our choice of ventilation profiles for human and mice, they were respectively 9.0% and 6.8% for $nTiO_2$, and 16.0% and 20.0% for PQ. A scenario of occupational exposure was chosen, involving a woman working for 8 months during pregnancy, with a nasal minute ventilation of 19 L/min, corresponding to workers achieving light duties (Winter-Sorkina et Cassee 2003), and a human alveolar surface of 102 m² (Stone et al. 1992). We assumed that this worker would be exposed 8 h per day, 5 days per week, 20 days per month using the Yeh/Schum symmetric lung model without clearance. Concerning the aerosol exposure to $nTiO_2$ or PQ separately, the cumulative alveolar deposition would be 384 µg/m² for $nTiO_2$ and 229 µg/m² for PQ. Similarly, according to the duration of our study, a minute ventilation of 22.2 mL/min (Tankersley, Fitzgerald, et Kleeberger 1994), an alveolar surface of 0.05 m² (Stone et al., 1992) mice received a cumulative alveolar deposition of 298 µg/m² and 9 µg/m² for $nTiO_2$ and PQ respectively, i.e., an alveolar deposited mass of 78% for $nTiO_2$, and 4% for PQ in comparison to a pregnant worker exposed for 8 months, to the maximal acceptable dose according to the NIOSH occupational Exposure Limit. Similarly, the deposit fraction of the aerosol of PQ + $nTiO_2$ was assessed. Due to similar aerosol characteristics in terms of size distribution, no significant difference was found in its alveolar deposition in comparison to $nTiO_2$ alone in humans nor in mice.

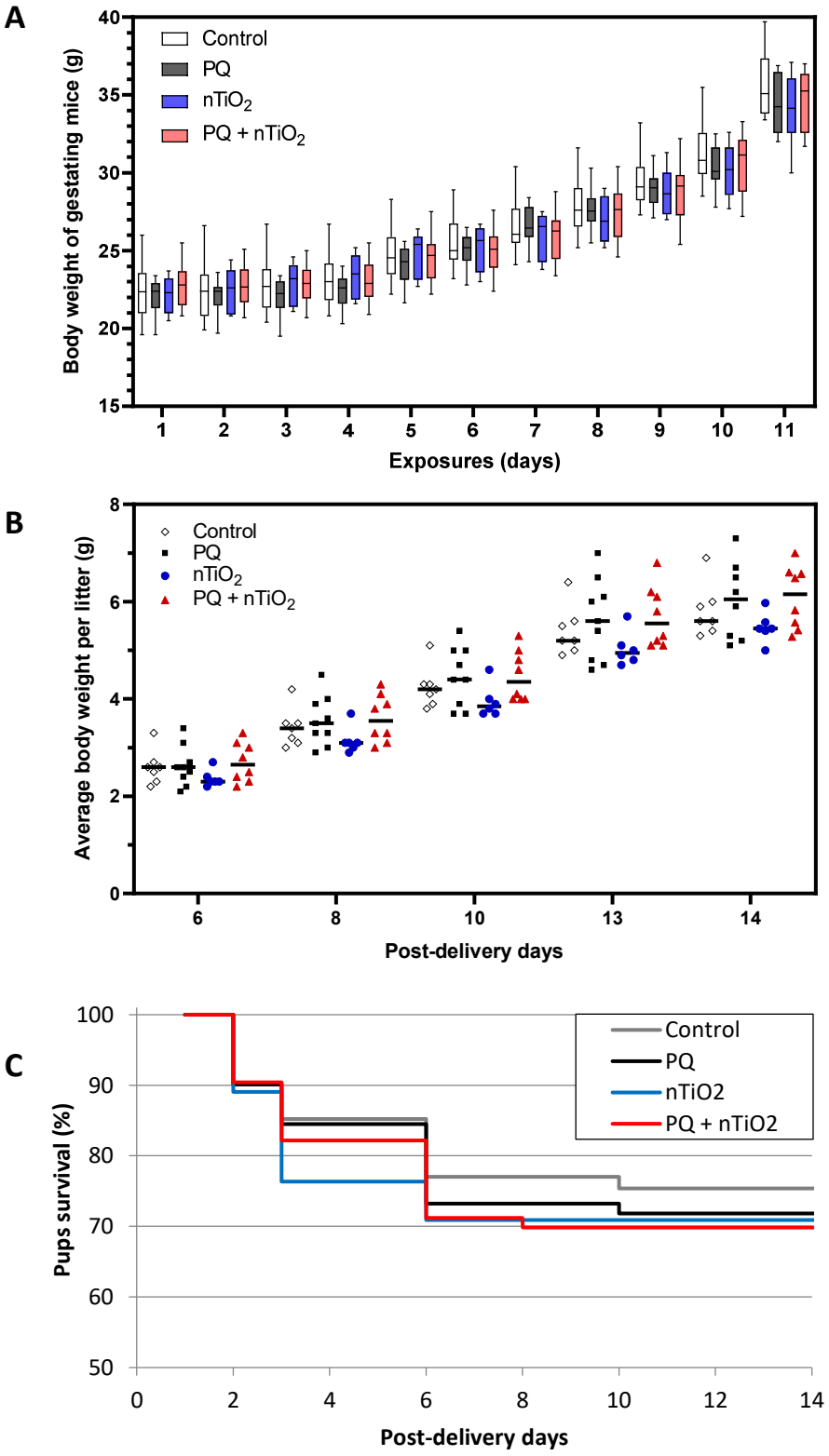


Figure S1. Follow-up of (A) gestating mice body weight (N=12) presented as boxplots, (B) average body weight of different litters (N≥6) from gestational day 6 to gestational day 14, (C) pups survival from birth to their sacrifice. No significant difference was highlighted using two-way ANOVA between groups in the reported parameters.

Table S3. Characteristics of litters for each treatment group.

Aerosol		**Control**	**PQ**	**$nTiO_2$**	**PQ + $nTiO_2$**
Pups per litter		6.9 ± 1.7	6.9 ± 1.1	7.1 ± 1.2	7.3 ± 1.0
Survival (%)		75	72	71	70
Sex ratio		0.8	1.1	0.8	0.6
Weight	Body (g)	5.8 ± 0.6	6.0 ± 0.9	5.5 ± 0.5	6.0 ± 0.7
	Liver (mg)	170.6 ± 20.1	180.7 ± 31.6	154.4 ± 14.5	175.4 ± 27.6
	Lung (mg)	88.1 ± 7.8	89.2 ± 12.5	80.2 ± 5.9	93.3 ± 7.0
	Kidney (mg)	70.2 ± 7.9	76.1 ± 13.1	65.6 ± 12.6	70.3 ± 10.9
	Brain (mg)	375.1 ± 16.5	382.3 ± 11.0	370.0 ± 21.6	373.5 ± 19.6

N ≥ 40 per group. Results are presented as means ± SD for the number of pups, organ weight, body weights and they were measured at post gestational day (PND) 14. Survival was assessed between PND1 and PND14, the day of sacrifice. The sex ratio is reported as the number of females/males. No significant difference was highlighted between groups using one-way ANOVA in the reported parameters.

Table S4A. GSEA gene sets for PQ. FDR: false discovery rate.

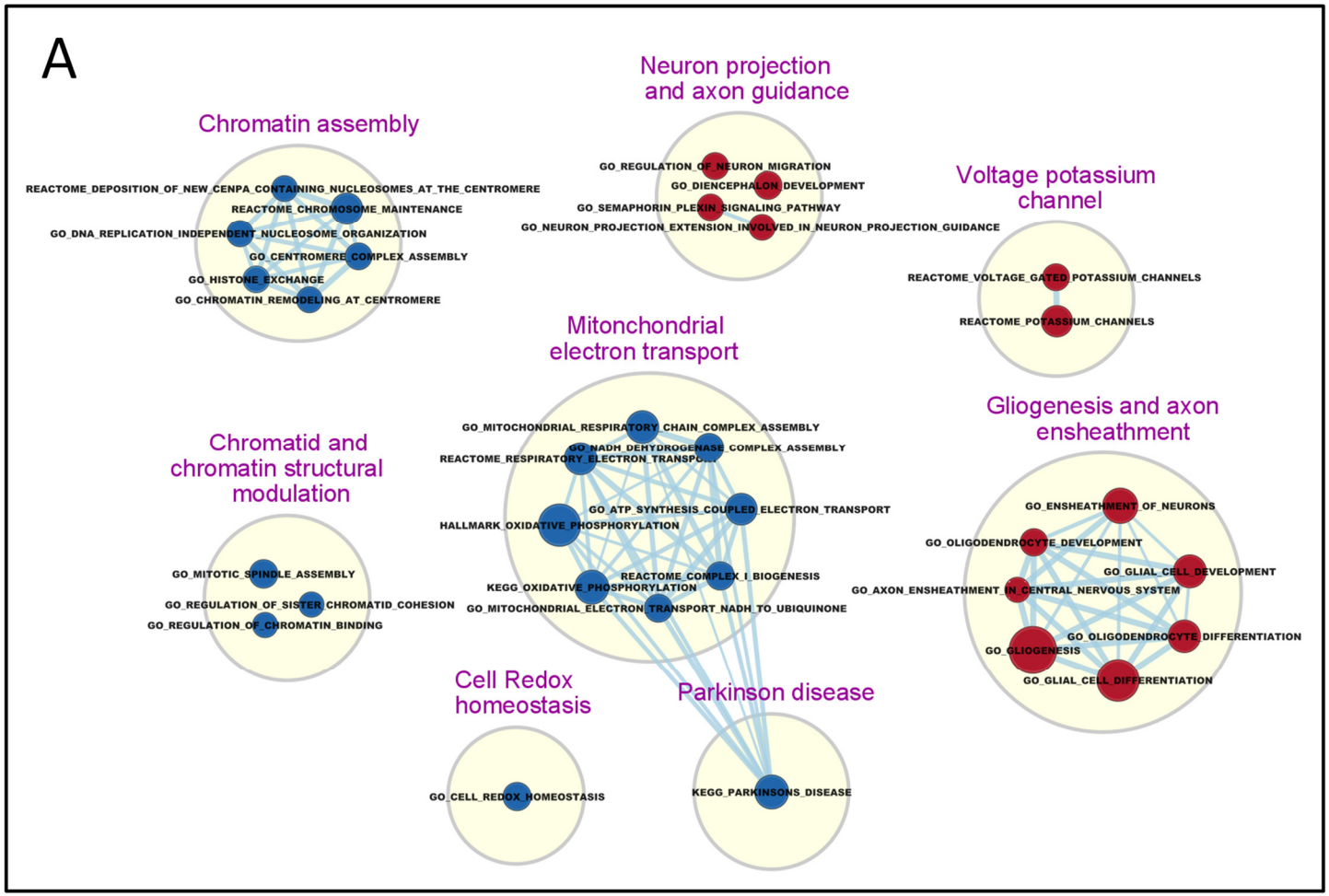
	Gene set description	Enrichment score	FDR	Gene set size	p-value
Paraquat	GO axon ensheathment in central nervous system	0.7	0.01	21	0.0015
	GO oligodendrocyte development	0.64	0.01	44	<0.0001
	GO semaphorin plexin signaling pathway	0.61	0.02	37	<0.0001
	GO neuron projection extension involved in neuron projection guidance	0.59	0.05	35	<0.0001
	Reactome voltage gated potassium channels	0.59	0.04	39	0.0014
	GO regulation of neuron migration	0.57	0.05	39	<0.0001
	GO oligodendrocyte differentiation	0.55	0.01	96	<0.0001
	GO diencephalon development	0.55	0.05	51	<0.0001
	GO glial cell development	0.53	0.01	101	<0.0001
	GO ensheathment of neurons	0.52	0.01	125	<0.0001
	Reactome potassium channels	0.51	0.05	84	<0.0001
	GO glial cell differentiation	0.48	0.01	196	<0.0001
	GO gliogenesis	0.45	0.04	251	<0.0001
	KEGG oxidative phosphorylation	-0.38	0.05	111	<0.0001
	Hallmark oxidative phosphorylation	-0.39	0.01	196	<0.0001
	GO ATP synthesis coupled electron transport	-0.4	0.04	88	<0.0001
	GO mitochondrial respiratory chain complex assembly	-0.4	0.03	97	<0.0001
	Reactome chromosome maintenance	-0.41	0.04	88	<0.0001
	GO mitotic spindle assembly	-0.43	0.04	55	<0.0001
	KEGG parkinsons disease	-0.44	0.01	110	<0.0001
	GO NADH dehydrogenase complex assembly	-0.46	0.02	62	<0.0001
	GO cell redox homeostasis	-0.47	0.03	52	<0.0001
	GO mitochondrial electron transport NADH to ubiquinone	-0.47	0.02	50	<0.0001
	GO histone exchange	-0.47	0.04	36	0.0032
	Reactome complex I biogenesis	-0.49	0.01	53	<0.0001
	Reactome respiratory electron transport	-0.5	0.01	96	<0.0001
	GO regulation of sister chromatid cohesion	-0.54	0.05	21	<0.0001
	GO DNA replication independent nucleosome organization	-0.55	0.01	36	<0.0001
	GO regulation of chromatin binding	-0.55	0.04	21	0.0057
	GO centromere complex assembly	-0.57	0.01	38	<0.0001
	Reactome deposition of new CENPA containing nucleosomes at the centromere	-0.58	0.02	28	<0.0001
	GO chromatin remodeling at centromere	-0.6	0.01	29	<0.0001

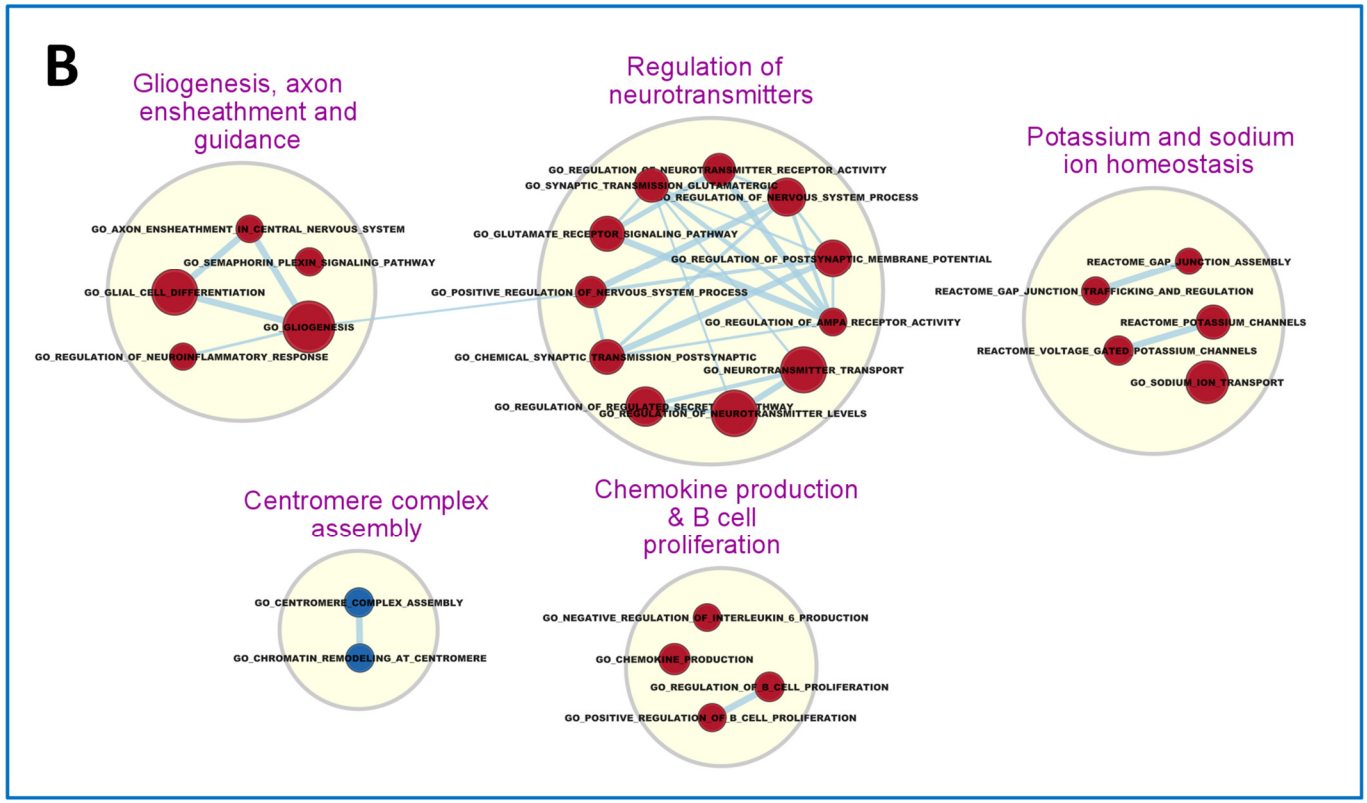
Table S4B. GSEA gene sets for $nTiO_2$. FDR: false discovery rate.

	Gene set description	Enrichment score	FDR	Gene set size	p-value
$nTiO_2$	GO regulation of neuroinflammatory response	0.71	0.01	18	<0.0001
	Reactome gap junction assembly	0.7	0.03	17	<0.0001
	GO axon ensheathment in central nervous system	0.66	0.03	21	<0.0001
	GO regulation of ampa receptor activity	0.66	0.02	24	<0.0001
	GO negative regulation of Interleukin-6 production	0.63	0.03	23	<0.0001
	Reactome voltage gated potassium channels	0.63	0.01	39	<0.0001
	GO positive regulation of B cell proliferation	0.62	0.02	28	0.0016
	Reactome gap junction trafficking and regulation	0.62	0.02	29	<0.0001
	GO regulation of B cell proliferation	0.56	0.03	41	<0.0001
	Reactome potassium channels	0.56	0.01	84	<0.0001
	GO semaphorin plexin signaling pathway	0.55	0.05	37	0.0015
	GO chemical synaptic transmission postsynaptic	0.53	0.01	89	<0.0001
	GO regulation of neurotransmitter receptor activity	0.53	0.01	70	<0.0001
	GO regulation of nervous system process	0.53	0.01	121	<0.0001
	GO synaptic transmission glutamatergic	0.52	0.01	82	<0.0001
	GO positive regulation of nervous system process	0.52	0.04	57	<0.0001
	GO chemokine production	0.52	0.04	57	<0.0001
	GO regulation of postsynaptic membrane potential	0.51	0.01	117	<0.0001
	GO glutamate receptor signaling pathway	0.49	0.03	93	<0.0001
	GO regulation of regulated secretory pathway	0.44	0.05	134	<0.0001
	GO glial cell differentiation	0.43	0.04	196	<0.0001
	GO sodium ion transport	0.43	0.05	165	<0.0001
	GO regulation of neurotransmitter levels	0.43	0.04	200	<0.0001
	GO neurotransmitter transport	0.43	0.05	196	<0.0001
	GO gliogenesis	0.41	0.05	251	<0.0001
	GO centromere complex assembly	-0.59	0.01	38	<0.0001
	GO chromatin remodeling at centromere	-0.61	0.03	29	<0.0001

Table S4C. GSEA gene sets for PQ + $nTiO_2$. FDR: false discovery rate.

	Gene set description	Enrichment score	FDR	Gene set size	p-value
Paraquat + $nTiO_2$	GO collagen biosynthetic process	0.66	0.03	31	<0.0001
	GO dendrite extension	0.62	0.04	33	<0.0001
	Reactome voltage gated potassium channels	0.61	0.04	39	<0.0001
	Reactome potassium channels	0.58	0.01	84	<0.0001
	GO regulation of neurotransmitter receptor activity	0.57	0.02	70	<0.0001
	GO regulation of synaptic vesicle exocytosis	0.57	0.02	72	<0.0001
	GO acidic amino acid transport	0.55	0.04	63	<0.0001
	GO synaptic vesicle exocytosis	0.54	0.02	109	<0.0001
	GO regulation of postsynaptic membrane potential	0.54	0.02	117	<0.0001
	GO chemical synaptic transmission postsynaptic	0.54	0.03	89	<0.0001
	GO regulation of neurotransmitter transport	0.53	0.03	103	<0.0001
	GO regulation of synaptic vesicle cycle	0.52	0.03	105	<0.0001
	Reactome neurotransmitter receptors and postsynaptic signal transmission	0.5	0.03	167	<0.0001
	GO neurotransmitter secretion	0.5	0.03	156	<0.0001
	GO neurotransmitter transport	0.48	0.04	196	<0.0001
	GO vesicle mediated transport in synapse	0.48	0.04	195	<0.0001
	Reactome transmission across chemical synapses	0.48	0.03	222	<0.0001
	GO neuron projection extension	0.47	0.05	157	<0.0001
	GO regulation of neurotransmitter levels	0.47	0.04	200	<0.0001


A
Chromatin assembly
REACTOME_DEPOSITION_OF_NEW_CENPA_CONTAINING_NUCLEOSOMES_AT_THE_CENTROMERE
REACTOME_CHROMOSOME_MAINTENANCE
GO_DNA_REPLICATION_INDEPENDENT_NUCLEOSOME_ORGANIZATION
GO_CENTROMERE_COMPLEX_ASSEMBLY
GO_HISTONE_EXCHANGE
GO_CHROMATIN_REMODELING_AT_CENTROMERE
Neuron projection and axon guidance
GO_REGULATION_OF_NEURON_MIGRATION
GO_DIENCEPHALON_DEVELOPMENT
GO_SEMAPHORIN_PLEXIN_SIGNALING_PATHWAY
GO_NEURON_PROJECTION_EXTENSION_INVOLVED_IN_NEURON_PROJECTION_GUIDANCE
Voltage potassium channel
REACTOME_VOLTAGE_GATED_POTASSIUM_CHANNELS
REACTOME_POTASSIUM_CHANNELS
Mitonchondrial electron transport
GO_MITOCHONDRIAL_RESPIRATORY_CHAIN_COMPLEX_ASSEMBLY
GO_NADH_DEHYDROGENASE_COMPLEX_ASSEMBLY
REACTOME_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPO...
GO_ATP_SYNTHESIS_COUPLED_ELECTRON_TRANSPORT
HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION
REACTOME_COMPLEX_I_BIOGENESIS
KEGG_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION
GO_MITOCHONDRIAL_ELECTRON_TRANSPORT_NADH_TO_UBIQUINONE
Gliogenesis and axon ensheathment
GO_ENSHEATHMENT_OF_NEURONS
GO_OLIGODENDROCYTE_DEVELOPMENT
GO_GLIAL_CELL_DEVELOPMENT
GO_AXON_ENSHEATHMENT_IN_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM
GO_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION
GO_GLIOGENESIS
GO_GLIAL_CELL_DIFFERENTIATION
Chromatid and chromatin structural modulation
GO_MITOTIC_SPINDLE_ASSEMBLY
GO_REGULATION_OF_SISTER_CHROMATID_COHESION
GO_REGULATION_OF_CHROMATIN_BINDING
Cell Redox homeostasis
GO_CELL_REDOX_HOMEOSTASIS
Parkinson disease
KEGG_PARKINSONS_DISEASE


B
Gliogenesis, axon ensheathment and guidance
GO_AXON_ENSHEATHMENT_IN_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM
GO_SEMAPHORIN_PLEXIN_SIGNALING_PATHWAY
GO_GLIAL_CELL_DIFFERENTIATION
GO_GLIOGENESIS
GO_REGULATION_OF_NEUROINFLAMMATORY_RESPONSE
Regulation of neurotransmitters
GO_REGULATION_OF_NEUROTRANSMITTER_RECEPTOR_ACTIVITY
GO_SYNAPTIC_TRANSMISSION_GLUTAMATERGIC
GO_REGULATION_OF_NERVOUS_SYSTEM_PROCESS
GO_GLUTAMATE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY
GO_REGULATION_OF_POSTSYNAPTIC_MEMBRANE_POTENTIAL
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_NERVOUS_SYSTEM_PROCESS
GO_REGULATION_OF_AMPA_RECEPTOR_ACTIVITY
GO_CHEMICAL_SYNAPTIC_TRANSMISSION_POSTSYNAPTIC
GO_NEUROTRANSMITTER_TRANSPORT
GO_REGULATION_OF_NEUROTRANSMITTER_LEVELS
Potassium and sodium ion homeostasis
REACTOME_GAP_JUNCTION_ASSEMBLY
REACTOME_GAP_JUNCTION_TRAFFICKING_AND_REGULATION
REACTOME_POTASSIUM_CHANNELS
REACTOME_VOLTAGE_GATED_POTASSIUM_CHANNELS
GO_SODIUM_ION_TRANSPORT
Centromere complex assembly
GO_CENTROMERE_COMPLEX_ASSEMBLY
GO_CHROMATIN_REMODELING_AT_CENTROMERE
Chemokine production & B cell proliferation
GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_INTERLEUKIN_6_PRODUCTION
GO_CHEMOKINE_PRODUCTION
GO_REGULATION_OF_B_CELL_PROLIFERATION
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_B_CELL_PROLIFERATION

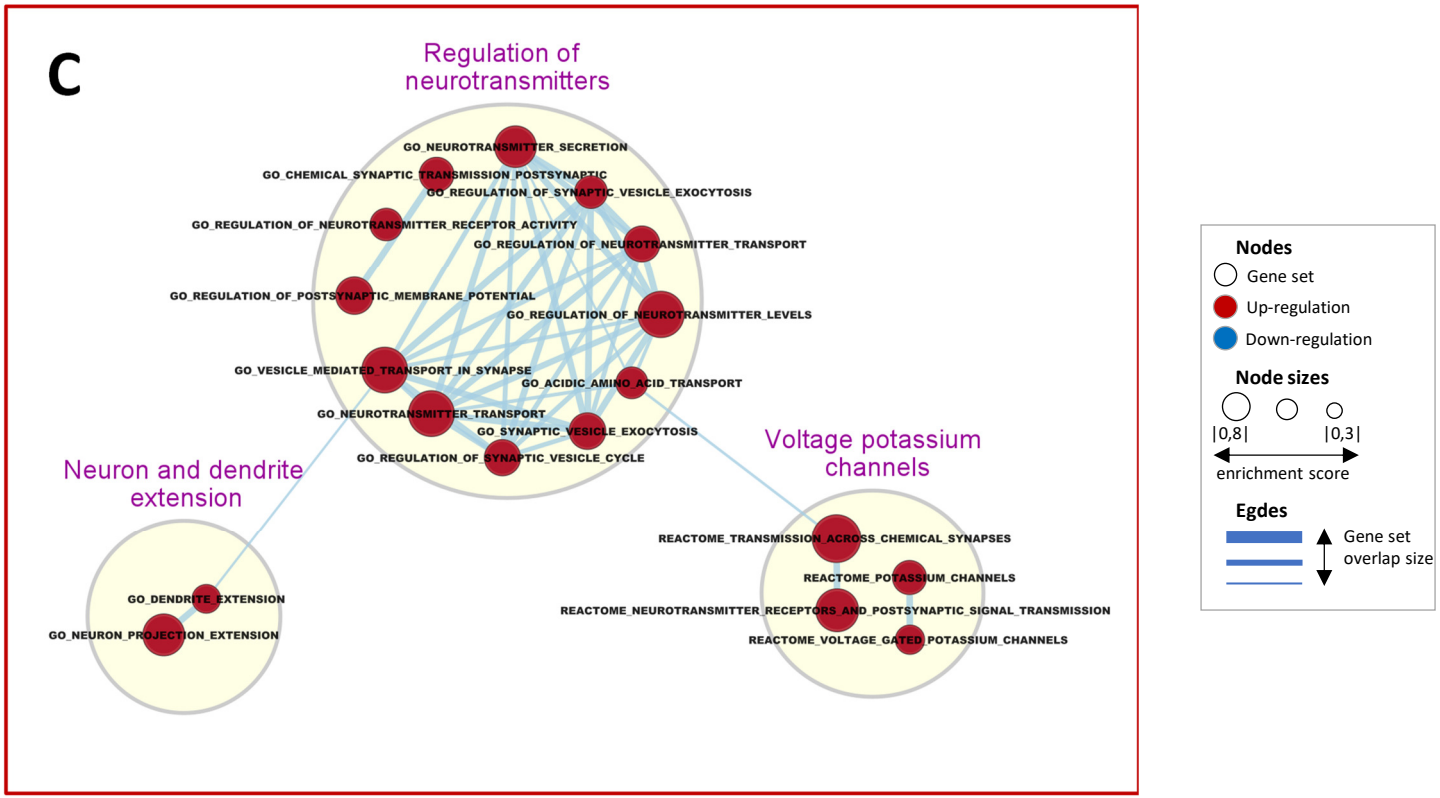


Figure S2. Gene Set Enrichment Analysis of striatum gene expression profiles for (A) PQ, (B) $nTiO_2$, (C) PQ+$nTiO_2$. Analysis made using three MSigDB genes collections: Gene Ontology (GO) Biological Process ontology and two Canonical Pathways gene sets derived from the KEGG pathway database and from the Reactome pathway database. Each node represents a gene set significantly enriched in comparison with controls. Nodes are clustered in pathways based on their shared genes and their common biological functions. Edges are filtered with an overlap cutoff: the minimum edge between two nodes depict that 35% of one gene set is common with the other.

REFERENCES

Agathokleous, Evgenios, ZhaoZhong Feng, Ivo Iavicoli, et Edward J. Calabrese. 2020. « Nano-Pesticides: A Great Challenge for Biodiversity? The Need for a Broader Perspective ». Nano Today 30: 100808.

Ait-Bali, Yassine, Saadia Ba-M'hamed, et Mohammed Bennis. 2016. « Prenatal Paraquat exposure induces neurobehavioral and cognitive changes in mice offspring ». Environmental Toxicology and Pharmacology 48: 53-62.

Anders, Simon, Paul Theodor Pyl, et Wolfgang Huber. 2015. « HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data ». Bioinformatics 31(2): 166-69.

Anderson, Timothy et al. 2020. « Paraquat Inhalation, a Translationally Relevant Route of Exposure: Disposition to the Brain and Male-Specific Olfactory Impairment in Mice ». Toxicological Sciences (kfaa183). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa183 (4 janvier 2021).

Barouki, Robert et al. 2012. « Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health ». Environmental Health 11(1): 42.

Bencsik, Anna, Philippe Lestaevel, et Irina Guseva Canu. 2018. « Nano- and Neurotoxicology: An Emerging Discipline ». Progress in Neurobiology 160: 45-63.

Bindea, Gabriela et al. 2009. « ClueGO: A Cytoscape Plug-in to Decipher Functionally Grouped Gene Ontology and Pathway Annotation Networks ». Bioinformatics (Oxford, England) 25(8): 1091-93.

Bongaerts, Eva et al. 2020. « Translocation of (ultra)fine particles and nanoparticles across the placenta; a systematic review on the evidence of in vitro, ex vivo, and in vivo studies ». Particle and Fibre Toxicology 17(1): 56.

Boukhzar, Loubna et al. 2016. « Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease ». Antioxidants & Redox Signaling 24(11): 557-74.

Boyes, William K., et Christoph van Thriel. 2020. « Neurotoxicology of Nanomaterials ». Chemical Research in Toxicology 33(5): 1121-44.

Brouwer, Maartje et al. 2017. « Environmental Exposure to Pesticides and the Risk of Parkinson's Disease in the Netherlands ». Environment International 107: 100-110.

Ceña, V., et P. Játiva. 2018. « Nanoparticle crossing of blood-brain barrier: A road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases ». Nanomedicine 13(13): 1513-16.

Chester, G., et R. J. Ward. 1984. « Occupational Exposure and Drift Hazard during Aerial Application of Paraquat to Cotton ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology 13(5): 551-63.

Ciesielski-Treska, J. et al. 1998. « Chromogranin A Induces a Neurotoxic Phenotype in Brain Microglial Cells ». The Journal of Biological Chemistry 273(23): 14339-46.

Cline, Melissa S. et al. 2007. « Integration of Biological Networks and Gene Expression Data Using Cytoscape ». Nature Protocols 2(10): 2366-82.

Colle, Dirleise et al. 2020. « Early Postnatal Exposure to Paraquat and Maneb in Mice Increases Nigrostriatal Dopaminergic Susceptibility to a Re-Challenge with the Same Pesticides at Adulthood: Implications for Parkinson's Disease ». Neurotoxicity Research 37(1): 210-26.

Coscollà, C. et al. 2013. « Particle size distributions of currently used pesticides in a rural atmosphere of France ». Atmospheric Environment 81: 32-38.

Costello, Sadie et al. 2009. « Parkinson's Disease and Residential Exposure to Maneb and Paraquat from Agricultural Applications in the Central Valley of California ». American Journal of Epidemiology 169(8): 919-26.

Cui, Yonghua et al. 2014. « Prenatal Exposure to Nanoparticulate Titanium Dioxide Enhances Depressive-like Behaviors in Adult Rats ». Chemosphere 96: 99-104.

Eng, Lawrence F., et Roopa S. Ghirnikar. 1994. « GFAP and Astrogliosis ». Brain Pathology 4(3): 229-37.

Engler-Chiurazzi, E.B. et al. 2016. « Impacts of prenatal nanomaterial exposure on male adult Sprague-Dawley rat behavior and cognition ». Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues 79(11): 447-52.

Florêncio, Maria et al. 2004. « Photodegradation of Diquat and Paraquat in aqueous solutions by titanium dioxide: Evolution of degradation reactions and characterisation of intermediates ». Chemosphere 55: 345-55.

Fukumoto, Keita et al. 2018. « Identification of Genes Regulating GABAergic Interneuron Maturation ». Neuroscience Research 134: 18-29.

Gilbertson, L.M. et al. 2020. « Guiding the design space for nanotechnology to advance sustainable crop production ». Nature Nanotechnology 15(9): 801-10.

Gollamudi, Seema et al. 2012. « Concordant Signaling Pathways Produced by Pesticide Exposure in Mice Correspond to Pathways Identified in Human Parkinson's Disease ». PLoS ONE 7(5). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341364/ (18 décembre 2020).

Grissa, Intissar et al. 2016. « The Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on Neuroinflammation Response in Rat Brain ». Environmental Science and Pollution Research 23(20): 20205-13.

Guillard, A. et al. 2020. « Basal Ti level in the human placenta and meconium and evidence of a materno-foetal transfer of food-grade TiO2 nanoparticles in an ex vivo placental perfusion model ». Particle and Fibre Toxicology 17(1): 51.

Hamdaoui, Quentin et al. 2021. « Metrological Characterization of an Aerosol Exposure Chamber to Explore the Inhalation Effects of the Combination of Paraquat and TiO2 Nano-Objects ». Aerosol and Air Quality Research 21: 200626-200626.

Hathaway, Q.A. et al. 2017. « Maternal-engineered nanomaterial exposure disrupts progeny cardiac function and bioenergetics ». American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 312(3): H446-58.

Hogberg, Helena T. et al. 2009. « Gene Expression as a Sensitive Endpoint to Evaluate Cell Differentiation and Maturation of the Developing Central Nervous System in Primary Cultures of Rat Cerebellar Granule Cells (CGCs) Exposed to Pesticides ». Toxicology and Applied Pharmacology 235(3): 268-86.

Ikegame, Tempei et al. 2013. « DNA Methylation of the BDNF Gene and Its Relevance to Psychiatric Disorders ». Journal of Human Genetics 58(7): 434-38.

Ingebrigtsen, K., I. Nafstad, et R.A. Andersen. 1984. « Distribution and Transplacental Transfer of Paraquat in Rats and Guinea-Pigs ». General Pharmacology: The Vascular System 15(3): 201-4.

«ISO/TS 80004-1:2015(fr), Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 1: Termes "coeur" ». https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:fr (20 avril 2021).

Jarabek, Annie M., Bahman Asgharian, et Frederick J. Miller. 2005. « Dosimetric Adjustments for Interspecies Extrapolation of Inhaled Poorly Soluble Particles (PSP) ». Inhalation Toxicology 17(7-8): 317-34.

Jomova, K., D. Vondrakova, M. Lawson, et M. Valko. 2010. « Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders ». Molecular and Cellular Biochemistry 345(1-2): 91-104.

Kah, M., R.S. Kookana, A. Gogos, et T.D. Bucheli. 2018. « A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues ». Nature Nanotechnology 13(8): 677-84.

Kah, Melanie, Nathalie Tufenkji, et Jason C. White. 2019. « Nano-Enabled Strategies to Enhance Crop Nutrition and Protection ». Nature Nanotechnology 14(6): 532-40.

Kamel, F. et al. 2007. « Pesticide Exposure and Self-Reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study ». American Journal of Epidemiology 165(4): 364-74.

Kookana, Rai S. et al. 2014. « Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks ». Journal of Agricultural and Food Chemistry 62(19): 4227-40.

Kuroda, Yukiko et al. 2012. « Parkin interacts with Klokin1 for mitochondrial import and maintenance of membrane potential ». Human Molecular Genetics 21(5): 991-1003.

Larsen, Ashley E., Steven D. Gaines, et Olivier Deschênes. 2017. « Agricultural Pesticide Use and Adverse Birth Outcomes in the San Joaquin Valley of California ». Nature Communications 8(1): 302.

Lee, Ji Hyun et al. 2011. « Exposure Assessment of Workplaces Manufacturing Nanosized TiO2 and Silver ». Inhalation Toxicology 23(4): 226-36.

Livak, Kenneth J., et Thomas D. Schmittgen. 2001. « Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method ». Methods 25(4): 402-8.

Love, Michael I., Simon Anders, Vladislav Kim, et Wolfgang Huber. 2015. « RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression ». F1000Research 4. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4670015/ (25 janvier 2021).

Lozowicka, Bozena. 2015. « Health Risk for Children and Adults Consuming Apples with Pesticide Residue ». Science of The Total Environment 502: 184-98.

Merico, Daniele et al. 2010. « Enrichment Map: A Network-Based Method for Gene-Set Enrichment Visualization and Interpretation ». PloS One 5(11): e13984.

Mittra, Namrata et al. 2020. « Postnatal Zinc or Paraquat Administration Increases Paraquat or Zinc-Induced Loss of Dopaminergic Neurons: Insight into Augmented Neurodegeneration ». Molecular and Cellular Biochemistry. https://doi.org/10.1007/s11010-020-03694-x (17 février 2020).

Moisan, Frédéric et al. 2015. « Association of Parkinson's Disease and Its Subtypes with Agricultural Pesticide Exposures in Men: A Case–Control Study in France ». Environmental Health Perspectives 123(11): 1123-29.

Mooney, Michael A., et Beth Wilmot. 2015. « Gene Set Analysis: A Step-by-Step Guide ». American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics 168(7): 517-27.

Morshed, M.M. et al. 2010. « Airborne paraquat measurement and its exposure to spray operators in treated field environment ». International Journal of Agriculture and Biology 12(5): 679-84.

Naasz, Steffi, Rolf Altenburger, et Dana Kühnel. 2018. « Environmental Mixtures of Nanomaterials and Chemicals: The Trojan-Horse Phenomenon and Its Relevance for Ecotoxicity ». Science of The Total Environment 635: 1170-81.

Nicosia, Angelo et al. 2021. « TiO 2-Based Nanocomposites Thin Film Having Boosted Photocatalytic Activity for Xenobiotics Water Pollution Remediation ». Nanomaterials (Basel, Switzerland) 11(2). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33557321/ (30 avril 2021).

Nishimori, H. et al. 2009. « Influence of 70 Nm Silica Particles in Mice with Cisplatin or Paraquat-Induced Toxicity ». Die Pharmazie 64(6): 395-97.

Nist, Marliese Dion, et Rita H. Pickler. 2019. « An Integrative Review of Cytokine/Chemokine Predictors of Neurodevelopment in Preterm Infants ». Biological Research for Nursing 21(4): 366-76.

Oczkowska, Anna, Wojciech Kozubski, Margarita Lianeri, et Jolanta Dorszewska. 2013. « Mutations in PRKN and SNCA Genes Important for the Progress of Parkinson's Disease ». Current Genomics 14(8): 502-17.

Phuinthiang, Patcharaporn, et Puangrat Kajitvichyanukul. 2018. « Degradation of paraquat from contaminated water using green TiO2 nanoparticles synthesized from Coffea arabica L. in photocatalytic process ». Water Science and Technology 79(5): 905-10.

Pimentel, David. 2005. « Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States ». Environment, Development and Sustainability 7(2): 229-52.

Potter, Kathleen A. et al. 2011. « Central Nervous System Dysfunction in a Mouse Model of Fa2h Deficiency ». Glia 59(7): 1009-21.

Qazi, G., et F.A. Dar. 2020. « Nano-agrochemicals: economic potential and future trends ». Nanobiotechnology in Agriculture: an Approach towards Sustainability: 185-93.

Richard, Sabine et al. 2020. « A Pivotal Genetic Program Controlled by Thyroid Hormone during the Maturation of GABAergic Neurons ». iScience 23(3): 100899.

Royland, Joyce E., Jinfang Wu, Nasser H. Zawia, et Prasada Rao S. Kodavanti. 2008. « Gene Expression Profiles in the Cerebellum and Hippocampus Following Exposure to a Neurotoxicant, Aroclor 1254: Developmental Effects ». Toxicology and Applied Pharmacology 231(2): 165-78.

Salama, A.K., N.M. Bakry, et M.B. Abou-Donia. 1993. « A review article on placental transfer of pesticides ». International Journal of Occupational Medicine and Toxicology 2(4): 383-97.

Sartori, Fabio, et Edgar Vidrio. 2018. « Environmental fate and ecotoxicology of paraquat: a California perspective ». Toxicological & Environmental Chemistry 100(5-7): 479-517.

Schummer, Claude et al. 2010. « Gas/Particle Partitioning of Currently Used Pesticides in the Atmosphere of Strasbourg (France) ». Air Quality, Atmosphere & Health 3(3): 171-81.

Shi, Hongbo, Ruth Magaye, Vincent Castranova, et Jinshun Zhao. 2013. « Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data ». Particle and Fibre Toxicology 10: 15.

Shimizu, M. et al. 2009. « Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse ». Particle and Fibre Toxicology 6.

Stapleton, P. A., C. R. McBride, J. Yi, et T. R. Nurkiewicz. 2015. « Uterine microvascular sensitivity to nanomaterial inhalation: An in vivo assessment ». Toxicology and Applied Pharmacology 288(3): 420-28.

Stone, K. C. et al. 1992. « Allometric Relationships of Cell Numbers and Size in the Mammalian Lung ». American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 6(2): 235-43.

Subramanian, Aravind et al. 2005. « Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles ». Proceedings of the National Academy of Sciences 102(43): 15545-50.

Sun, Yan et al. 2019. « Nano-Pesticides: A Great Challenge for Biodiversity? » Nano Today 28: 100757.

Takahashi, Yuta et al. 2010. « Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice ». The Journal of Toxicological Sciences 35(5): 749-56.

Tamayo, Pablo, George Steinhardt, Arthur Liberzon, et Jill P. Mesirov. 2012. « The Limitations of Simple Gene Set Enrichment Analysis Assuming Gene Independence ». Journal of Biomedical Informatics 45(2): 372-87.

Tankersley, C. G., R. S. Fitzgerald, et S. R. Kleeberger. 1994. « Differential control of ventilation among inbred strains of mice ». American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 267(5): R1371-77.

Tanner Caroline M. et al. 2011. « Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease ». Environmental Health Perspectives 119(6): 866-72.

Tomita, Masafumi et al. 2007. « Mouse Model of Paraquat-Poisoned Lungs and Its Gene Expression Profile ». Toxicology 231(2): 200-209.

Umezawa, M. et al. 2012. « Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information ». Journal of Toxicological Sciences 37(6): 1247-52.

United States Department of Agriculture, National Institute of Food and Agriculture (USDA). 2015. « USDA announces $4.6 Million for Nanotechnology Research ». https://nifa.usda.gov/announcement/usda-announces-46-millionnanotechnology- research (4 juin 2019).

Vohra, Muhammad Shariq, et Keiichi Tanaka. 2003. « Photocatalytic Degradation of Aqueous Pollutants Using Silica-Modified TiO2 ». Water Research 37(16): 3992-96.

Wang, Anthony et al. 2011. « Parkinson's Disease Risk from Ambient Exposure to Pesticides ». European Journal of Epidemiology 26(7): 547-55.

Wang, Yan et al. 2016. « The Application of Nano-TiO2 Photo Semiconductors in Agriculture ». Nanoscale Research Letters 11. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126030/ (7 novembre 2019).

Winter-Sorkina, et Flemming Cassee. 2003. « From concentration to dose: factors influencing airborne particulate matter deposition in humans and rats ». Toxicological Sciences.

Yang, M. S., H. W. Chan, et L. C. Yu. 2006. « Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activities Are Partially Responsible for Determining the Susceptibility of Cells to Oxidative Stress ». Toxicology 226(2): 126-30.

Zhang, L., Kladi A, et Verykios Xe. 1994. « Spectroscopic Study of the Effects of Carrier Doping on the Surface-Structure of Rh/TiO2 Catalysts and on Their Interaction with Co and H-2 ». Journal of Physical Chemistry 98(27): 6804-11.

Zhang, X., W. Li, et Z. Yang. 2015. « Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update ». Archives of Toxicology 89(12): 2207-17.

3. Résultats complémentaires

3.1. Expression hépatique des enzymes de la défense antioxydante

La Gpx1, la SOD2 et la CAT représentent trois enzymes clés de la défense antioxydante intracellulaire. Elles sont présentes de façon basale, notamment dans les cellules hépatiques, et peuvent être induites par la présence de composés oxydants. La superoxyde dismutase 2 (SOD2) joue un rôle essentiel anti-apoptotique contre le stress oxydant (élimination des ERO mitochondriales). De façon complémentaire aux résultats de l'article associé au neurodéveloppement, les niveaux d'expression de ces enzymes ont été évalués comme senseurs du stress oxydant hépatique potentiellement induit par les expositions prénatales aux aérosols d'intérêt. Ces résultats sont présentés en Figure 54. Aucune différence statistique n'est visible entre les groupes d'exposition, ce qui témoigne de l'absence d'effet hépatique induit par les aérosols chez les souriceaux exposés *in utero*.

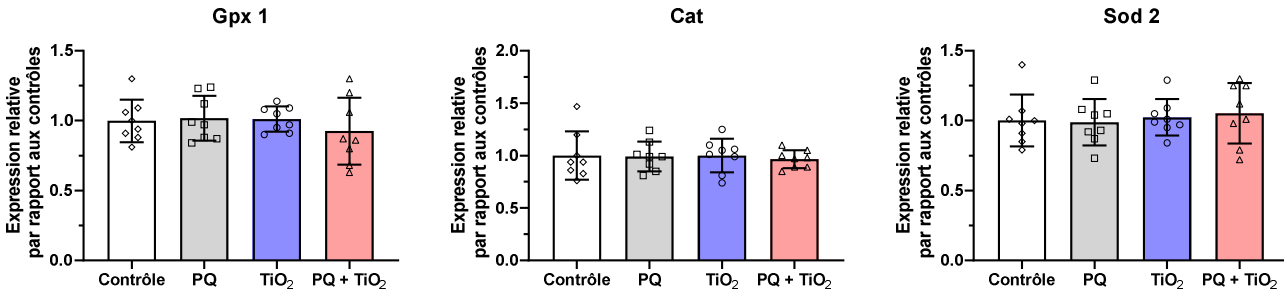


Figure 54. Expression relative par rapport au contrôle des enzymes de la défense antioxydante. N=8 par groupe d'exposition. Résultats exprimés sous la forme de moyennes ± SEM, chaque point correspond à un animal.

X. Effets neurotoxiques associés à l'exposition des souris prédisposées aux maladies neurodégénératives (NeuroTox)

1. Évolution du poids corporel des animaux

Le poids corporel a été utilisé comme paramètre de suivi hebdomadaire de l'état de santé général des souris aux cours des expositions aux aérosols, de la S0 (semaine d'entraînement au Rotarod) à la dernière semaine d'exposition (S7). Les groupes ont été constitués de manière à obtenir des animaux ayant un poids corporel homogène. Ainsi, le poids moyen était de 17,1 g ± 9% (S0) tout groupe d'exposition confondu, ce qui est en accord avec la déviation maximale à respecter en expérimentation chez le rongeur (maximum de 20%, (OECD TG 413)). Par ailleurs, les animaux avaient un âge moyen similaire (8,1 ± 1,0 semaines) lors du début des expositions (S1), également afin de minimiser la variabilité inter-groupe.

Les résultats présentés en Figure 55A, montrent l'évolution du poids corporel au cours du temps. De manière complémentaire, la Figure 55B montre l'évolution relative de la croissance pondérale des animaux. Globalement, les sessions d'inhalation des aérosols n'ont pas induit d'effets majeurs sur l'état général des souris. Néanmoins, une différence significative entre le groupe exposé au $nTiO_2$ par rapport au groupe contrôle a été mesurée à partir de la S5. Le groupe $nTiO_2$ a présenté une prise de poids moyenne inférieure de 11,2% (S7), cette différence ayant tendance à augmenter au cours des dernières semaines d'exposition.

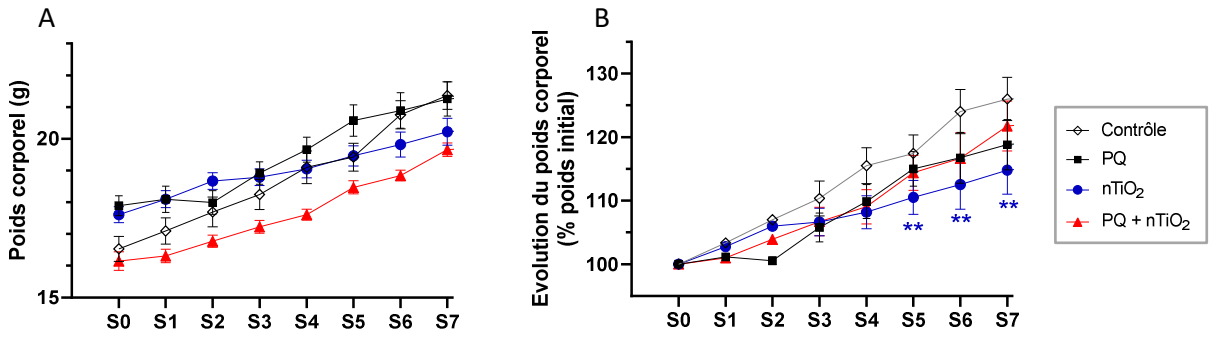


Figure 55. (A) Poids corporel des souris, (B) évolution du poids corporel relatif par rapport au poids initial (S0) en fonction des semaines d'exposition aux aérosols (S). Pour chaque groupe, N=24 (S0-S4), N=18 (S5) et N=12 (S6-S7). Données présentées sous la forme de moyennes ± SEM ; ** p-value <1%, utilisation d'un test statistique modèle mixte (maximum de vraisemblance restreint, réalisé via le logiciel Prism software (GraphPad 8.0) prenant en compte les données manquantes dues aux mises à mort des animaux).

2. Impact des traitements sur les performances locomotrices

Les traitements n'ont pas induit de différence statistique significative sur les performances locomotrices des animaux lors des deux tests Rotarod utilisés (Figure 56). À l'issue d'une semaine d'entraînement, les animaux ont acquis une valeur initiale moyenne aux deux tests de 287 ± 24 secondes en rotation continue, et de 142 ± 13 secondes en rotation en accélération. Ces valeurs sont globalement restées analogues au cours des semaines d'exposition, même si une légère tendance à la décroissance est visible pour les groupes PQ et PQ + $nTiO_2$ en rotation accélérée (- 4% des performances moyennes entre la première et la dernière semaine (Figure 56D). Les données de performance relative ont été représentées par régression linéaire des valeurs moyennes obtenues par les différents groupes d'animaux. Comme les variables comparées statistiquement (performances en fonction des groupes, interaction du temps) sont appariées et qu'elles présentent des données manquantes dues aux mises à mort réalisées à intervalle régulier, un modèle mixte a été utilisé pour comparer ces données. À ce titre, aucune différence significative n'a été établie au seuil de 5% (réalisé via le logiciel Prism software, GraphPad 8.0). L'allure des courbes suggère néanmoins un faible effet du temps sur les résultats du test en accélération dans les groupes PQ et PQ + $nTiO_2$ qui tendent à diminuer au cours des semaines d'exposition, mais la durée de l'étude n'a pas permis de confirmer cette tendance. Par conséquent, la motricité des souris au cours de l'étude ne semble pas être altérée par les traitements.

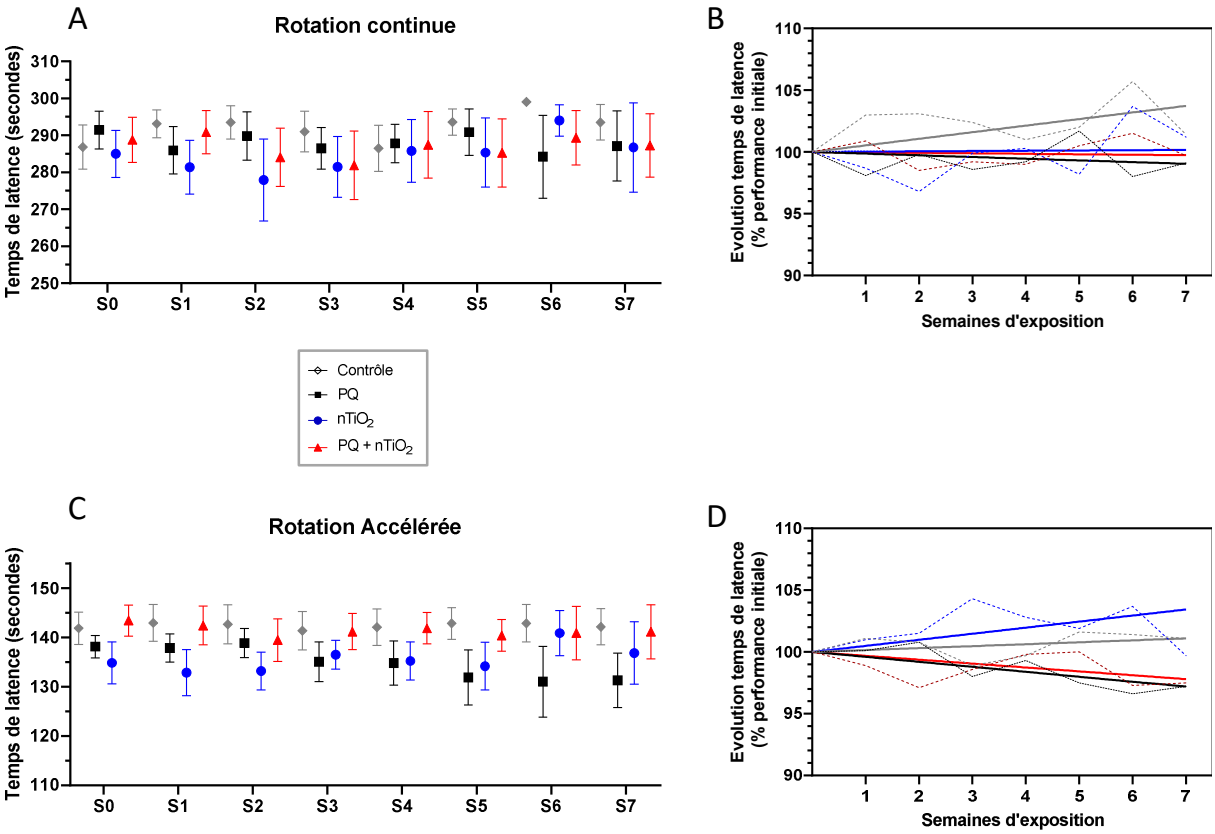


Figure 56. Résultats aux tests du Rotarod, mesurés de la S0 (dernier jour d'entraînement) correspondant aux performances basales des animaux, à la S7 (dernière semaine d'exposition). (A et B) résultats associés au test de rotation continue (20 rpm, 300 secondes), (C et D) résultats associés au test de rotation en accélération (de 5 rpm à 40 rpm, 150 secondes). (B et D) présentation de l'évolution relative du temps de latence (initialement caractérisé en S0) en fonction des semaines d'exposition, les pointillés correspondent à l'évolution mesurée, les traits pleins à la régression linéaire associée à ces résultats. Données présentées sous la forme de moyennes ± SEM.

3. Marqueurs plasmatiques de l'inflammation

Seuls deux marqueurs plasmatiques sur les huit recherchés au Luminex ont été détectés au-dessus de leur seuil de quantification (MMP12 et Cxcl1) (Figure 57). Hormis la chimiokine pro-inflammatoire Cxcl1 qui s'est avérée être anormalement basse dans le groupe PQ + $nTiO_2$ (S4) pour une raison technique inconnue, aucune augmentation de ces signaux inflammatoires n'a été observée, suggérant une absence d'inflammation systémique chez les souris exposées quotidiennement aux aérosols d'intérêt.

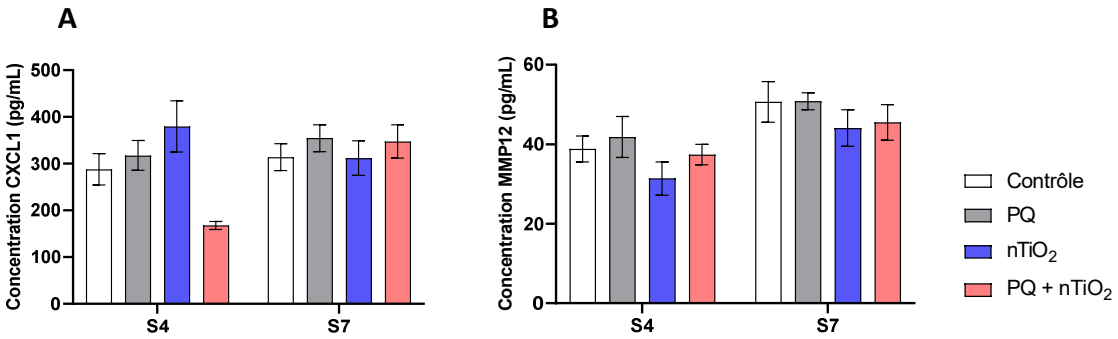


Figure 57. Quantification au Luminex de deux marqueurs de l'inflammation plasmatique chez les souris contrôles ou exposées aux aérosols d'intérêt à la semaine (S) S4 et S7 : (A) Cxcl1 (B) Mmp12. Données présentées sous la forme de moyennes ± SEM. N=6 animaux par groupe.

4. Mesures histologiques au niveau cérébral

Les données disponibles étant incomplètes, les résultats de cette partie ne sont pas présentés de façon exhaustive. Le détail du nombre d'échantillons disponibles utilisés pour ces analyses est présenté en Annexe (Tableau S1). L'obtention de coupes supplémentaires et reproductibles entre les différents groupes d'exposition devra être réalisée, afin de permettre ultérieurement de corroborer les observations issues de cette première étape préliminaire. Les analyses statistiques de comparaison de moyennes dans cette partie ont été réalisées, dès lors que 4 échantillons/groupe étaient disponibles au minimum. Pour ce faire, la normalité des données a été évaluée par deux tests (Shapiro-Wilk et D'Agostino-Pearson) (D'Agostino, 2017) suivis d'un test d'homoscédasticité de Bartlett (Sutradhar, 1996) grâce au logiciel Prism. Ces deux conditions validées, une analyse ANOVA à deux facteurs a été utilisée, dans le cas contraire, un test statistique non paramétrique a été effectué (Kruskal Wallis).

4.1. Analyse du marquage immunohistochimique de la TH

Une attention particulière a été portée sur le striatum, structure connue pour être une cible de l'effet neurotoxique du PQ, afin d'évaluer les altérations des voies dopaminergiques par la quantification immunohistochimique de la TH. Par ailleurs, son homogénéité et sa surface importante a permis l'obtention de zones reproductibles entre les différents échantillons afin d'obtenir des valeurs fiables en termes d'impact des expositions sur l'expression de ce marqueur.

Les données histologiques obtenues dans les trois groupes exposés aux aérosols pendant 7 semaines et comparées à celles du groupe contrôle sont présentées en Figure 58. Bien que le nombre restreint d'animaux disponibles dans les groupes PQ (N=3 individus) et PQ + $nTiO_2$ (N=4) ne permettent pas

encore d'étudier clairement les effets induits au sein de tous les groupes d'exposition, nous avons toutefois observé une diminution statistiquement significative du marquage dans les striatums des animaux exposés à l'aérosol de $nTiO_2$ (N=6) en comparaison du groupe contrôle (N=10). La surface TH-positive par rapport à la surface totale du striatum (exprimée en pourcentage ± écart-type) a été mesurée dans ces deux groupes comme étant de 22,2% (± 15,5%) et 40,6% (± 9,8%) respectivement, soit une diminution relative de 45% par rapport au groupe contrôle. Ces résultats suggèrent donc une perte des neurones dopaminergiques associée aux 7 semaines d'exposition à l'aérosol de $nTiO_2$.

Un autre point peut être souligné, deux groupes d'animaux contrôles (N=5/groupe) ont été utilisés afin d'évaluer l'effet de l'âge sur l'intensité du marquage de la TH dans le striatum. Deux groupes, l'un âgé de 2 mois et l'autre de 4 mois, ont ainsi été comparés, ces âges correspondant à ceux des animaux au début et à la fin des expositions. L'intensité du marquage était de 41% (± 11%) à 2 mois, et de 43% (± 8%) à 4 mois, ce qui montre qu'au cours de notre étude, les effets observés sont attribuables aux traitements et non pas au vieillissement des souris.

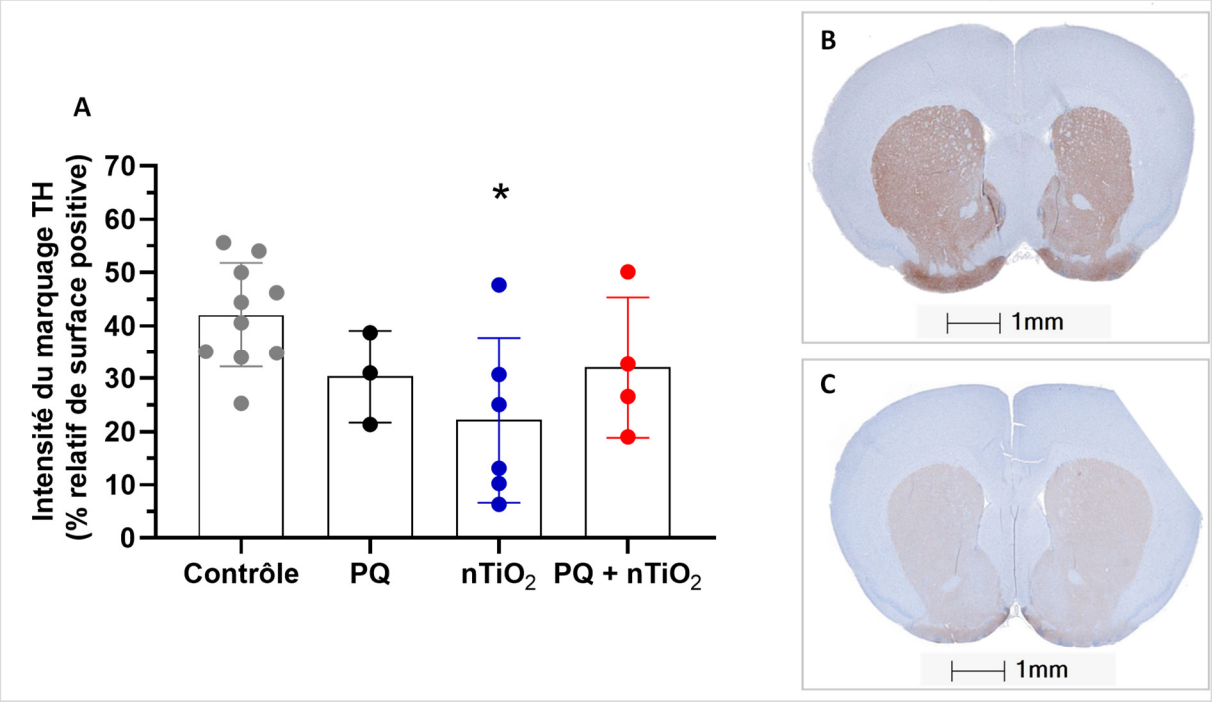


Figure 58. Effets des expositions aux aérosols d'intérêt pendant 7 semaines sur la quantification de l'immunomarquage TH dans le striatum gauche et droit. (A) Résultats présentés sous la forme du pourcentage de la surface moyenne TH-positive (± SEM) par rapport à la surface totale du striatum, un point correspondant à l'analyse d'un animal. Le test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les moyennes (groupe exposition/groupe contrôle) : p-value (groupe $nTiO_2$) = 0,02. Clichés représentatifs des striatums (B) du groupe contrôle, (C) du groupe $nTiO_2$.

Par ailleurs, les échantillons disponibles permettent de présenter l'évolution temporelle du marquage de la TH au sein des striatums du groupe d'exposition au PQ + $nTiO_2$ (Figure 59). La surface TH-positive par rapport à la surface totale du striatum (exprimée en pourcentage ± écart-type) correspondant à la 4ème semaine et la 7ème semaine d'exposition sont respectivement de 43,1% (± 15,3%) et de 32,8% (± 13,3%), soit une baisse relative de 24% au cours des 3 dernières semaines d'exposition. Néanmoins, le faible nombre d'animaux disponibles ne permet pas encore de confirmer statistiquement la significativité de cette tendance. Ces données suggèrent une diminution de l'expression de la TH au cours des semaines d'exposition, probablement à cause de la perte progressive des neurones dopaminergiques, mais qui semble moins importante que celle identifiée au sein du groupe d'exposition au $nTiO_2$ seul.

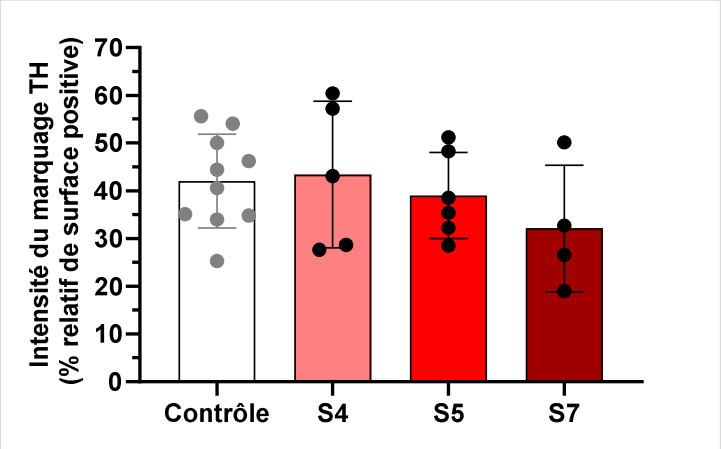


Figure 59. Effets des expositions pendant 4 (S4), 5 (S5) et 7 semaines (S7) à l'aérosol de PQ + $nTiO_2$ sur la quantification de l'immunomarquage TH dans le striatum gauche et droit. Données présentées sous la forme du pourcentage de la surface moyenne TH-positive (± SEM) par rapport à la surface totale du striatum, un point correspondant à l'analyse d'un animal.

4.2. Analyse du marquage immunohistochimique de Iba-1

La quantification du marquage Iba-1 dans les différentes aires cérébrales au cours des semaines d'exposition a permis l'analyse statistique des valeurs obtenues au sein des différents groupes de souris (Figure 60). Ceci dans le but d'évaluer l'effet sur la microglie de nos aérosols d'intérêt et d'étudier l'évolution temporelle de ce marqueur neuroinflammatoire.

À l'issue de la 5ème semaine d'exposition (S5), une différence significative a été mis en évidence dans le cortex du groupe exposé au $nTiO_2$ (Figure 60B). Ces animaux ont présenté une augmentation du

nombre de cellules microgliales (248 ± 72 cellules positives/mm²) par rapport au groupe témoin (180 ± 40 cellules positives/mm²), ce qui représente une augmentation moyenne de 38% relativement aux animaux contrôles.

De façon similaire, des augmentations significatives de ce marqueur ont été mises en évidence dans le groupe d'exposition au PQ + $nTiO_2$ dans le cortex et le striatum (Figure 60C). L'accroissement cortical de la densité cellulaire a été observé à la S4 (264 ± 44 cellules positives/mm²) et la S5 (260 ± 84 cellules positives/mm²), ce qui correspond à une augmentation moyenne d'environ 46% par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, une augmentation striatale a aussi été mesurée à la S5 (248 ± 120 cellules positives/mm²) et la S7 (217 ± 76 cellules positives/mm²). Étonnamment, cette dernière est plus importante à la 5ème semaine, ce qui se traduit par un accroissement de 92% par rapport au groupe témoin. Bien que non significative, nous pouvons aussi noter une tendance à l'augmentation progressive et linéaire au cours des semaines d'exposition dans le tronc cérébral de ce même groupe de souris (+64% à la S7 en comparaison du groupe contrôle). Cette zone du SNC s'avère particulièrement intéressante au regard du fait que c'est un relais possible lors de la translocation directe des NM inhalés qui peut avoir lieu via le nerf trijumeau.

Par conséquent, nous pouvons observer une prolifération des cellules microgliales au niveau du cortex et du striatum des animaux exposés au PQ + $nTiO_2$, ainsi qu'une tendance à l'augmentation progressive dans leur tronc cérébral au cours des semaines d'exposition. Dans le groupe exposé au $nTiO_2$, seule une augmentation corticale a été mesurée, d'une amplitude similaire à celle du groupe exposé au mélange. Ces éléments suggèrent la présence d'une réactivité microgliale dans ces aires cérébrales et cette augmentation de la densité cellulaire microgliale évoque la présence d'un contexte neuroinflammatoire en réponse à l'inhalation des aérosols de $nTiO_2$ et de PQ + $nTiO_2$. Aucun effet n'a été mis en lumière dans le groupe d'exposition au PQ, ce qui suggère que l'exposition au PQ seul n'a pas suffi à induire ces mêmes effets.

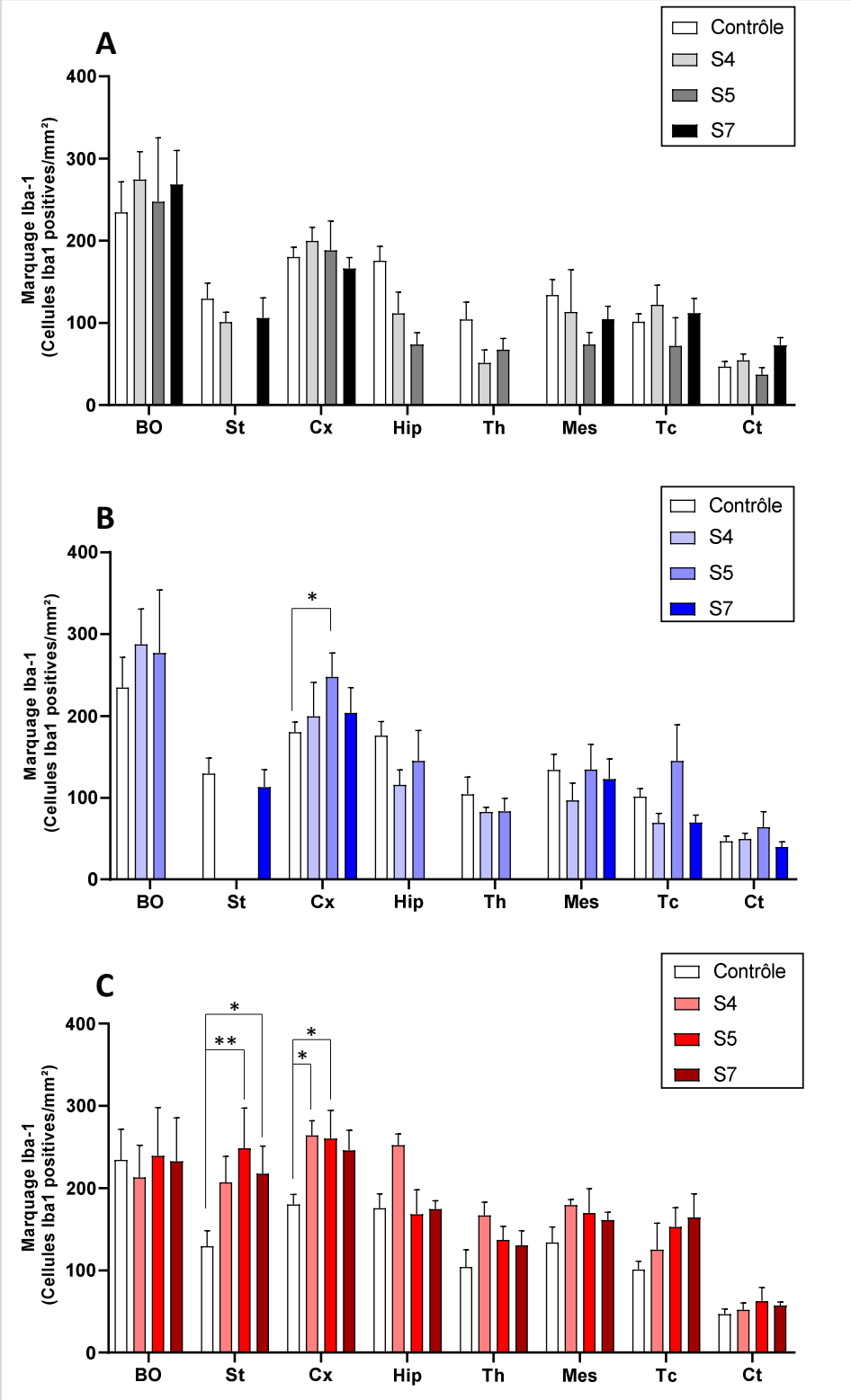


Figure 60. Effet des expositions pendant 4 (S4), 5 (S5) et 7 semaines (S7) aux aérosols de (A) PQ, (B) $nTiO_2$ et (C) PQ + $nTiO_2$ sur la quantification de l'immunomarquage Iba-1 dans les aires cérébrales d'intérêt. Données présentées sous la forme du nombre de cellules Iba-1 positives (± SEM) pondéré par la surface totale analysée. La comparaison des moyennes a été réalisée en utilisant un test ANOVA avec tests de comparaisons multiples de Dunnett. Le détail du nombre d'individus utilisés pour l'analyse et représentés graphiquement peut être trouvé en annexe (Tableau S1). Nomenclature : BO (bulbes olfactifs) ; St (striatum) ; Cx (cortex) ; Hip (hippocampe) ; Th (Thalamus) ; Mes (mésencéphale) ; TC (tronc cérébral) ; Ct (cervelet). *p-value<0,05 ** p-value<0,01.

4.3. Analyse du marquage immunohistochimique de la GFAP

La quantification du marquage GFAP des différentes aires cérébrales n'a pas permis de mettre en évidence des effets différentiels entre groupes d'animaux sur la population d'astrocytaire (Figure 61). Le manque de données et le bruit de fond induit par l'usage de l'anticorps anti-GFAP a rendu la quantification faiblement reproductible, avec une hétérogénéité notable entre les coupes.

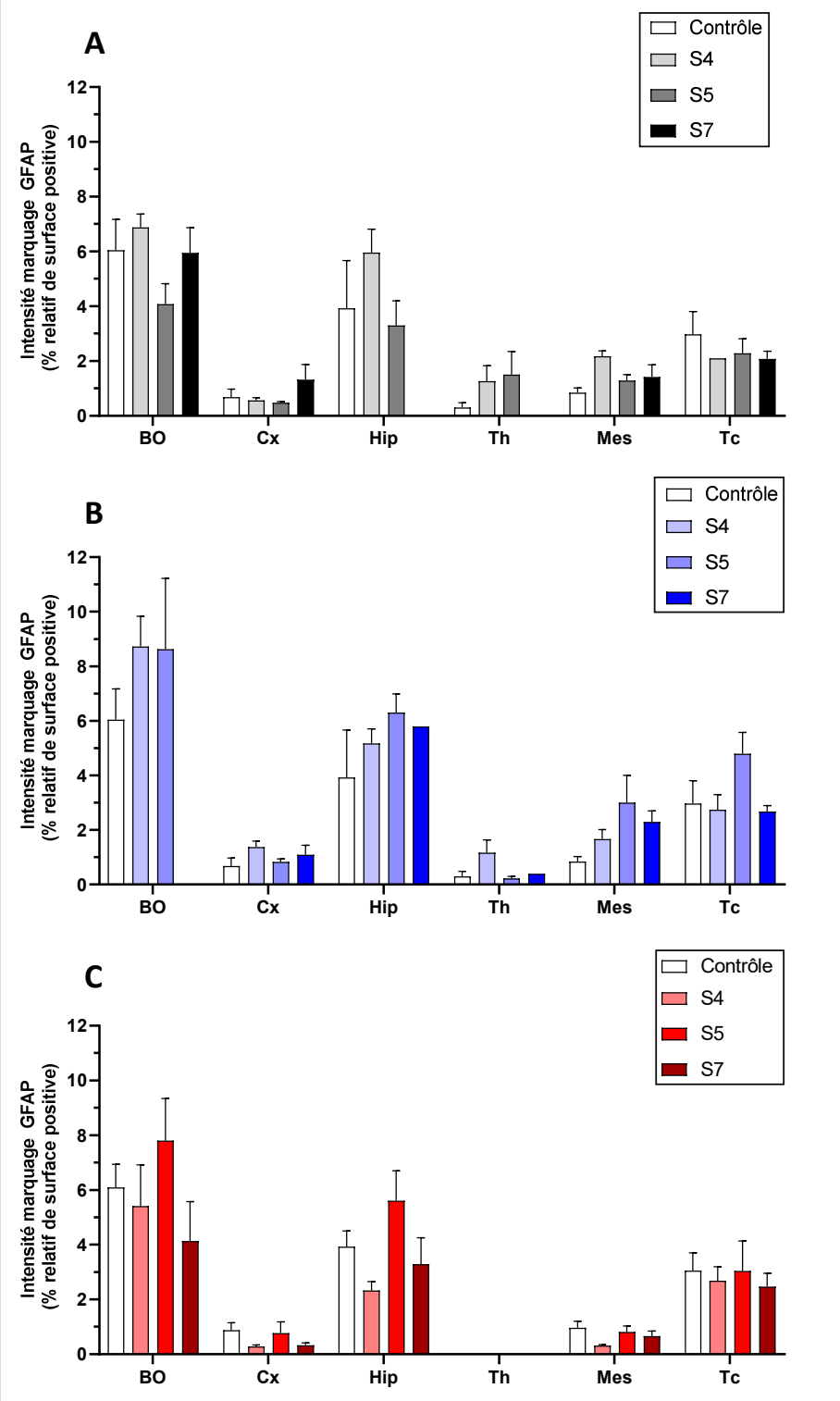


Figure 61. Effet des expositions pendant 4 (S4), 5 (S5) et 7 semaines (S7) aux aérosols de (A) PQ, (B) $nTiO_2$ et (C) PQ + $nTiO_2$ sur la quantification de l'immunomarquage GFAP dans les aires cérébrales d'intérêt. Données préliminaires présentées sous la forme du pourcentage de surface GFAP-positive (± SEM) par rapport à la surface totale des aires cérébrales analysées. Le détail du nombre d'individus utilisés pour l'analyse et représentés graphiquement peut être trouvé en Annexe (Tableau S1). Nomenclature : BO (bulbes olfactifs) ; St (striatum) ; Cx (cortex) ; Hip (hippocampe) ; Th (Thalamus) ; Mes (mésencéphale) ; TC (tronc cérébral) ; Ct (cervelet).

5. Dose retenue de titane au niveau pulmonaire

Les résultats issus de la quantification élémentaire du titane dans le SNC et les poumons des souris exposées 7 semaines sont présentés dans le Tableau 13. Le seuil de détection n'a pas été atteint lors de l'analyse des cerveaux, ce qui suggère une absence de translocation cérébrale du $nTiO_2$ inhalé par les souris dans les deux groupes d'exposition ($nTiO_2$ et PQ + $nTiO_2$). Au niveau pulmonaire, une concentration en titane a été mesurée dans les deux groupes d'exposition considérés, contrairement au groupe contrôle : 31 ± 6 µg de titane dans le groupe exposé au $nTiO_2$, et 19 ± 2 µg dans le groupe exposé au PQ + $nTiO_2$, soit une dose retenue inférieure de 39% par rapport au groupe $nTiO_2$.

Tableau 13. Mesure de la dose retenue de titane

Organes	Mesures	Contrôle	$nTiO_2$	PQ + $nTiO_2$
Poumons	Masse poumons (mg)	125 ± 24	130 ± 17	117 ± 9
	Concentration Ti (mg/kg organe)	< 0,4	239 ± 14	165 ± 21
	Masse Ti (µg)	-	31 ± 6	19 ± 2
Cerveaux	Concentration Ti (mg/kg organe)	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Résultats de la quantification du titane effectuée par ICP-MS sur les cerveaux et les poumons des groupes contrôle, $nTiO_2$ et PQ + $nTiO_2$. (N=3 animaux par groupe). Lors des essais réalisés au LNE, l'incertitude de mesure relative des concentrations a été évaluée à environ 20% et les rendements (justesse) à 95% en moyenne, validant ainsi la méthode utilisée. Données présentées sous la forme de moyennes ± écart-type.

Pour caractériser la dosimétrie associée à l'exposition aux aérosols et tenter d'expliquer la différence de dose retenue de titane au niveau pulmonaire entre les groupes exposés au $nTiO_2$ et aux PQ + $nTiO_2$, une modélisation a été réalisée grâce au logiciel MPPD.

La fraction de dépôt pulmonaire associée à chacun des aérosols est rapportée au sein de la Figure 62, cette fraction étant définie comme le pourcentage de particules (en masse) étant déposées à chaque inspiration. Ainsi, la fraction de dépôt pulmonaire (alvéoles et bronchioles terminales) a été estimée respectivement à 6,8% et 6,9% pour le $nTiO_2$ et le PQ + $nTiO_2$. De façon complémentaire, les résultats présentant la dose déposée pour chacun des aérosols durant 7 semaines dans les voies aériennes sont rapportés dans le Tableau 14. Ces données montrent un dépôt pulmonaire en $nTiO_2$ de 47 µg et 48 µg respectivement pour les groupes exposés au $nTiO_2$ et aux PQ + $nTiO_2$. Ces résultats indiquent une analogie importante des doses théoriquement déposées en titane au niveau pulmonaire entre ces deux

groupes d'exposition. Par conséquent, le phénomène de dépôt ne semble pas pouvoir expliquer la différence de la dose retenue de titane mesurée par ICP-MS entre les groupes exposé au $nTiO_2$ et au mélange de PQ + $nTiO_2$.

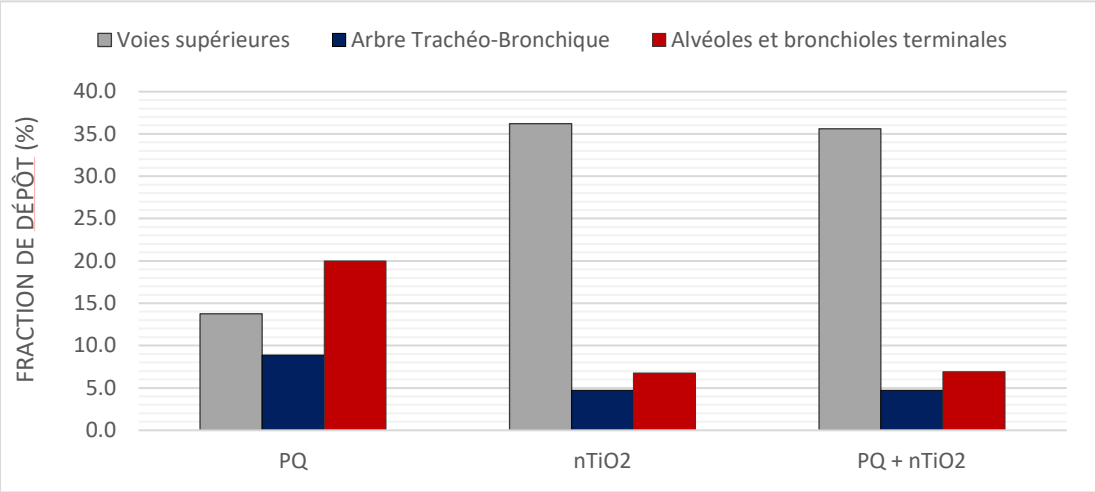


Figure 62. Résultats de la modélisation MPPD réalisée chez la souris, en utilisant les caractéristiques particulaires évaluées lors de la phase métrologique. Fraction de dépôt dans les différentes parties des voies aériennes, pour chacun des aérosols d'intérêt.

Tableau 14. Dose déposée dans les voies aériennes des animaux

Voies aériennes	**Dose déposée (µg/souris)**		
	PQ	$nTiO_2$	PQ + $nTiO_2$
Total	3.0	333	330
Voies aériennes supérieures	1.0	253	249
Arbre trachéo-bronchique	0.6	33	33
Alvéoles et bronchioles terminales	1.4	47	48

Dose déposée (sans clairance) pour chacun des trois aérosols d'exposition, durant la totalité de la durée de l'étude NeuroTox (7 semaines). Les animaux ont reçu une masse totale par poids corporel en moyenne de 158 µg de PQ/kg et 17,5 mg de $nTiO_2$/kg respectivement pour les groupes de PQ et $nTiO_2$.

Nous avons réalisé une simulation avec MPPD de la dose retenue de titane dans les poumons (alvéoles et bronchioles terminales) au cours des 7 semaines d'exposition (Figure 62), en prenant en

compte la clairance pulmonaire du $nTiO_2$ chez la souris. La dose retenue entre le premier jour d'exposition et le jour de la mise à mort des animaux (durée de 49 jours) a été évaluée à 28 µg de $nTiO_2$, pour une dose totale déposée de 47 µg dans les alvéoles et bronchioles terminales. L'estimation de cette dose retenue pour le groupe d'exposition au PQ + $nTiO_2$ a donné un résultat strictement identique.

En outre, la valeur estimée de 28 µg de $nTiO_2$ est cohérente avec la valeur mesurée en ICP-MS chez les souris du groupe d'exposition au $nTiO_2$. Cette similitude entre les valeurs mesurées et estimées via MPPD confirme ainsi la validité des paramètres d'entrée du modèle utilisés pour évaluer la dose reçue par les souris. En conséquence, il est possible que la présence du PQ en mélange avec le $nTiO_2$ joue un rôle sur la distribution du titane une fois déposé dans les poumons et/ou sur sa demi-vie pulmonaire. Ces paramètres non évalués au cours de cette étude, pourraient expliquer la différence de dose retenue de titane entre les groupes exposés au $nTiO_2$ et aux PQ + $nTiO_2$

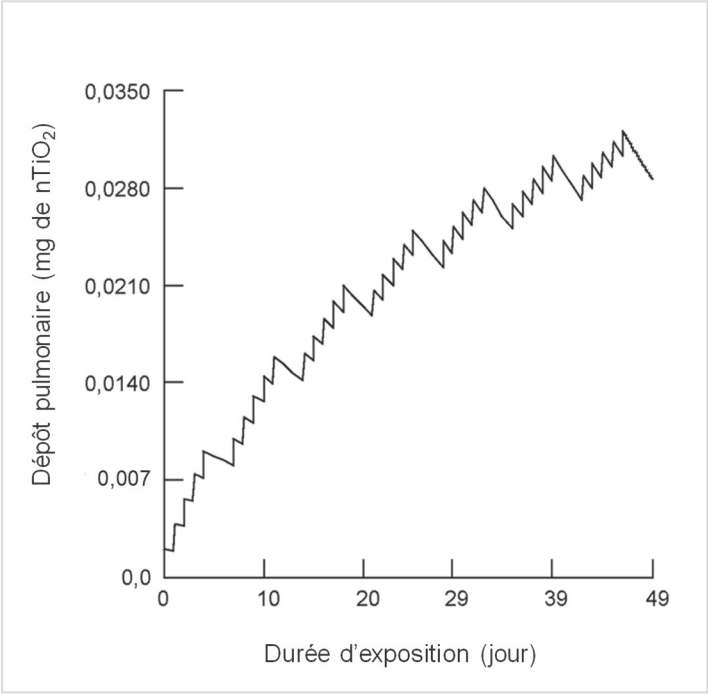


Figure 62. Résultats de la modélisation MPPD du dépôt pulmonaire calculé avec clairance chez la souris, évaluant la dose retenue de $nTiO_2$ dans les poumons des animaux au cours de la campagne d'exposition NeuroTox. Elle est estimée à 28 µg au jour de la mise à mort (J49).

Chapitre 4 : Discussion, perspectives et conclusion

XI. Discussion

En premier lieu, les objectifs de ce travail doctoral concernaient la mise au point, la caractérisation et la validation d'un dispositif expérimental d'exposition aux aérosols pouvant être utilisé en routine dans une animalerie conventionnelle. S'inscrivant dans une démarche d'harmonisation des protocoles expérimentaux utilisés en toxicologie de l'inhalation, notre dispositif devait respecter les exigences liées aux dispositifs d'exposition aux aérosols utilisés chez le rongeur, afin de proposer une approche fiable, reproductible, permettant un suivi dosimétrique en temps réel des concentrations d'exposition.

Par la suite, une étude toxicologique a ainsi été réalisée chez la souris, avec comme objectif l'évaluation des effets neurodéveloppementaux et neurotoxiques de l'exposition au PQ, au $nTiO_2$ ou à leur mélange modélisant un NPe, afin d'étudier la survenue d'effets cocktails sur le SNC. Deux modèles de souris complémentaires ont été utilisés, pour étudier d'une part les effets d'une exposition prénatale sur le striatum des souriceaux par une méthode transcriptomique, et d'autre part pour mesurer les effets d'une exposition subchronique chez l'animal prédisposé à développer une maladie neurodégénérative.

1. Discussion méthodologique

1.1. Aérosols générés

Les tailles particulaires associées à la pulvérisation agricole du PQ n'ont pas été rapportées dans la littérature. Par conséquent, nous ne pouvons pas estimer précisément quelle serait l'exposition professionnelle ou résidentielle, associée aux particules de PQ émises lors de son utilisation. La pulvérisation des pesticides en conditions agricoles produit des gouttes d'une taille primaire très différente en fonction des outils d'épandage, pouvant aller du micron jusqu'au millimètre[31] (American Society of Agricultural and Biological Engineers). Lors de leur pulvérisation, une fraction variable des pesticides est dispersée dans l'atmosphère, en particulier dans la fraction particulaire au sein d'une gamme de tailles comprises entre 0,01 et 1 µm (Coscollà et al., 2013), soit celle correspondant à nos aérosols. Au vu de la demi-vie atmosphérique du PQ (jusqu'à 64 jours), et de sa capacité à s'adsorber rapidement sur les particules du sols[32], il est probable qu'il puisse se retrouver par dérive et par érosion éolienne au sein de cette fraction particulaire. Notre modèle d'exposition correspond ainsi aux particules pouvant dériver à la suite de leur pulvérisation, qui sont générées dans une gamme de tailles susceptibles d'être inhalées, plutôt qu'aux particules primaires générées lors des épandages.

[31] https://extensionpublications.unl.edu/assets/html/g1773/build/g1773.htm

[32] Manuel sur l'Environnement (Volume III): Catalogue des Normes Antipollution (GTZ/BMZ, 1996, 663 pages). Chapitre 5.4.4.Paraquat

Dans notre étude, le dépôt alvéolaire évalué chez les animaux puis extrapolé à l'être humain, ne représente qu'une fraction de ce à quoi une femme pourrait être exposée professionnellement au cours de sa grossesse. Les concentrations en aérosols mises en œuvre correspondent donc à des doses faibles, considérées comme théoriquement sans effet toxique. Toutefois, notons que cette estimation se fonde sur un scénario d'exposition professionnelle à une concentration massique constante au cours du travail journalier. Ce choix est arbitraire mais nécessaire, car les conditions réelles d'exposition rencontrées sur le terrain sont dépendantes d'un grand nombre de facteurs (type de substances, climat, outils employés, équipements de protection etc.) provoquant une variabilité importante des concentrations d'exposition. Chester et Woolen (1982) ont rapporté des concentrations massiques quotidiennes moyennes de 5 ± 21 µg/m³ chez les travailleurs qui pulvérisaient manuellement du PQ. Néanmoins, la concentration journalière pouvait atteindre 93 µg/m^3, ce qui est en accord avec les concentrations massiques rapportées dans des conditions similaires par Morshed et al. (2010) (125 µg/m³) et cohérent avec les concentrations utilisées dans notre étude.

Le rapport massique utilisé en $nTiO_2$ et en PQ n'est pas forcément représentatif de la formulation d'un NPe. Certains brevets rapportent l'usage de $nTiO_2$ pour ses propriétés photocatalytiques sur des plants de tomates, dopé au zinc (avec un rapport titane zinc de 800 :1) et à une concentration de 0,7% sous forme de suspension colloïdale aqueuse (Averett and Averett, 2017). Le rapport massique de $nTiO_2$ et PQ dans notre mélange est un modèle probablement différent de celui qui pourrait être utilisé en agriculture. Ce choix possède une pertinence toxicologique, car il a été élaboré pour générer une concentration massique de nos aérosols située au-dessus de la dose sans effet, afin d'obtenir des effets observables des substances seules, à mettre en regard des effets du mélange. À notre connaissance, aucune donnée liée à un mélange d'herbicide et de $nTiO_2$ n'est actuellement rapportée. Il serait nécessaire d'étudier les effets du mélange avec d'autres rapports massiques en PQ/$nTiO_2$ afin de tirer des conclusions relatives à un usage agricole de ces substances.

La méthode utilisée dans notre étude, s'est avérée sensible pour détecter des effets de l'exposition aux aérosols d'intérêt. Nos résultats corroborent ceux obtenus par d'autres études chez la souris, ayant utilisé des doses bien plus importantes. Shimizu et al. (2009) ont réalisé une exposition prénatale de 400 µg de $nTiO_2$ par souris (injections sous-cutanées). Ils ont aussi observé que le $nTiO_2$ pouvait causer une altération de l'expression génique au sein du striatum, mettant en évidence des altérations associées aux neurotransmetteurs, à l'inflammation et au stress oxydant jusqu'au 21ème jour de vie post-natale. Nos résultats font également écho à l'étude de Gollamudi et al. (2012), qui ont analysé les conséquences de l'exposition aiguë au PQ (injection sous-cutanée, 10 mg/kg/j) sur le transcriptome dans le striatum de la souris adulte, entraînant une dérégulation des voies de signalisation liées à la MP. Par ailleurs, nos observations sont similaires à celles de Ait-Bali et al. (2016), ayant montré que l'exposition des souris gestantes au PQ induisait des altérations neurologiques et comportementales chez la progéniture, à une dose bien plus élevée (10 mg/kg, voie orale) que celle utilisée dans notre étude durant la gestation (dose

déposée estimée à 38 µg/kg). Bien que plus difficile à mettre en œuvre, l'inhalation présente donc un double avantage, elle apparaît d'une part comme une méthode sensible pour étudier les effets neurotoxiques de l'exposition répétée aux doses faibles de polluants atmosphériques, d'autre part elle correspond à un scénario d'exposition plus réaliste en comparaison des autres voies d'exposition.

1.2. Le modèle murin

Nous n'avons pas observé de signe de stress chez les souris durant les expositions, en termes de comportement (activité, agressivité, réponse à la manipulation) et d'apparence (état du pelage, toilettage), paramètres reflétant l'état de santé général des animaux (Carstens and Moberg, 2000). Les souriceaux n'ont pas subi de séparation maternelle et de manipulations répétées après leur naissance, facteurs de stress majeur (Plotsky and Meaney, 1993) pouvant modifier leur état neurophysiologique (Daniels et al., 2004 ; Hsu et al., 2003). De surcroît, concernant les conditions d'exposition des souris, la comparaison entre le groupe témoin et les groupes exposés durant la gestation, n'a pas montré de différence significative concernant la croissance pondérale ou les paramètres gestationnels. Ces éléments attestent de l'absence d'effet secondaire induit par l'utilisation de notre dispositif d'inhalation. Ceci est en accord avec les exigences d'éthique en expérimentation animale pour raffiner les méthodes d'études toxicologiques. Nous pouvons donc considérer que les résultats mis en évidence au cours de nos analyses sont imputables aux effets de l'exposition aux substances d'intérêt.

Les modèles de souris permettent d'intégrer les paramètres toxicologiques essentiels, comme le dépôt dans les voies respiratoires, le passage des barrières biologiques, la survenue d'effets à faible dose. Cependant, ces modèles *in vivo* présentent certaines caractéristiques au niveau de leur anatomie respiratoire non partagées avec l'être humain (Fröhlich and Salar-Behzadi, 2014). Leur respiration est uniquement nasale, ce qui privilégie en général un dépôt dans les voies aériennes supérieures. Cet épithélium nasal est richement vascularisé, et comporte des cavités permettant d'augmenter la surface de contact entre l'air et l'épithélium olfactif, qui peut agir à la fois comme un filtre à particules, et constituer un lieu de dépôt privilégié des aérosols. La géométrie de leurs voies respiratoires diffère, d'une part à cause de leur taille, plus étroite, d'autre part à cause de la ramification différente de leurs poumons. En outre, le volume de leur thorax par rapport au reste de leur corps est bien plus faible en comparaison de l'être humain, ce qui induit une fréquence respiratoire plus élevée chez la souris. Par conséquent, ces paramètres doivent être pris en compte dans des modèles mathématiques comme MPPD pour pouvoir transposer les données obtenues à l'homme.

Le modèle murin utilisé comme modèle gestationnel présente plusieurs limites. Le passage placentaire des NM est modulé en fonction du stade de la gestation (Hougaard et al., 2015), car la structure et la perméabilité du placenta évoluent au cours de la grossesse, ce qui explique en partie que la vulnérabilité aux toxiques soit différente durant le développement. Il a par exemple été montré chez

la souris que le transfert de la mère au fœtus de nanoparticules d'or était plus important avant le 10ème jour de gestation (H. Yang et al., 2012). Par ailleurs, les souris ont été exposées uniquement du 6ème au 18ème jour de gestation, alors qu'une femme enceinte peut être exposée de façon chronique (en amont de la grossesse, après la naissance, durant l'allaitement etc.). Une autre temporalité d'exposition, par exemple depuis le premier jour de la gestation, aurait probablement induit des conséquences plus prononcées chez les souriceaux. Ce choix méthodologique permet néanmoins d'évaluer cette période spécifique, connue pour être sensible aux altérations neurodéveloppementales. De plus, il existe des différences notables entre l'homme et la souris concernant le rôle d'échange du placenta, dont la mise en contact avec le sang maternel ne se fait qu'au 14ème jour de gestation chez la souris, alors qu'elle a lieu dès la fin du premier trimestre de grossesse chez l'être humain (Chavatte-Palmer and Tarrade, 2016). Des différences existent aussi concernant la séquence temporelle du neurodéveloppement. La myélinisation survient après la naissance chez les rongeurs mais commence avant la naissance (durant le dernier trimestre de grossesse) chez les humains (Gumusoglu and Stevens, 2019).

La lignée murine TgM83 est un modèle d'étude couramment utilisé dans l'étude des α-synucléinopathies telles que la MP (Giasson et al., 2002; Luk et al., 2012b, 2012a; Masuda-Suzukake et al., 2013; Naudet et al., 2017; Wang et al., 2020). Ce modèle s'apparente au schéma de progression pathologique des formes familiales de la MP plutôt qu'aux cas idiopathiques, différents dans leur étiologie. Même si la localisation des inclusions pathologiques d'asyn chez ces animaux ne correspond pas exactement à celle observée dans le tableau clinique de la MP (Giasson et al., 2002), ces marqueurs sont particulièrement abondants dans le tronc cérébral et dans le striatum, ce qui coïncide avec les signes anatomopathologiques mis en évidence chez l'être humain (Shoji et al., 2000). Ce modèle possède donc certains aspects moléculaires des synucléinopathies humaines avec l'avantage de permettre d'étudier expérimentalement les effets pathologiques associés à l'exposition aux NPe, notamment par la recherche de marqueurs protéiques évocateurs du développement d'une synucléinopathie.

1.3. Outils analytiques du transcriptome

Les données obtenues en RNA-seq et en RT-qPCR ont permis de montrer des résultats complémentaires sur le striatum des souriceaux. Notre analyse s'est focalisée sur cette aire cérébrale pour son homogénéité cellulaire importante, sa sensibilité aux altérations neurodéveloppementales (Richard et al., 2020) et sa vulnérabilité spécifique à la neurotoxicité du PQ. Il est important de noter que ces techniques d'analyse ne permettent pas d'établir si les modifications géniques mesurées sont provoquées par un changement dans la composition cellulaire du SNC, ce qui nécessiterait une analyse histologique approfondie des striatums. Ainsi, la variation de l'abondance d'un transcrit peut refléter soit la dérégulation d'un gène, soit une variation du nombre de cellules qui l'expriment. Sur la base du RNA-seq uniquement, à un seul stade de développement, les résultats demeurent hypothétiques et

nécessitent des outils d'interprétation comme ceux utilisés au cours de notre étude. En particulier, l'utilisation de GSEA permet d'éviter de se focaliser arbitrairement sur certains gènes pour vérifier une hypothèse de départ.

La RT-qPCR est l'un des outils les plus utilisés pour déterminer les niveaux d'ARNm des systèmes biologiques. Cependant, plusieurs étapes critiques lors de son exécution affectent la précision et l'interprétation des résultats, telles que la qualité de l'ARNm, l'existence potentielle de plusieurs isoformes associées à un même gène, l'efficacité de l'amplification, et le choix de contrôles internes (Derveaux et al., 2010). *A contrario*, le RNA-seq est de plus en plus considéré comme une référence pour décrire le transcriptome dans son ensemble et il présente l'avantage de s'affranchir de certaines limitations liées à la RT-qPCR (Everaert et al., 2017), en apportant des données fiables à partir d'un faible nombre d'échantillons. Cet avantage permet d'avoir recours à un nombre plus restreint d'animaux, ce qui est en accord avec la règle éthique des « 3R » ayant pour objectif de réduire l'utilisation des animaux en expérimentation *in vivo* (Richmond, 2000). Il fournit une information impartiale (sans *a priori*) sur l'ensemble des transcrits des échantillons biologiques, avec la possibilité d'évaluer l'expression des différentes isoformes (Whitley et al., 2016). Le traitement des données représente un défi de taille. Au vu du nombre total de transcrits analysés (environ 55 000) et de la variance importante des gènes faiblement exprimés, il faut encadrer de façon rigoureuse le risque de voir apparaître des faux positifs. Pour cela, Deseq2 est une méthode de normalisation des données qui permet de faire un tri des informations en amont de leur interprétation par des outils d'analyse comme GSEA (Love et al., 2015, 2014). Deseq2 encadre le risque de détecter de faux positifs de façon stricte, et permet de mesurer des variations plus faibles qu'en RT-qPCR en utilisant l'ensemble des données génomiques pour mesurer la distribution des niveaux d'expression. Néanmoins, le coût financier du RNA-seq demeure une limite de taille, notamment pour l'analyse d'un grand nombre de banques génomiques, contrairement à la RT-qPCR. Les données produites par ces deux techniques ne sont pas toujours concordantes, car elles ne rendent pas compte de la même façon de l'abondance des ARNm. Cependant, d'une façon générale les résultats des « fold-change » fournis par les deux méthodes sont analogues. Everaert et al. (2017) ont ainsi montré que les résultats contradictoires entre ces techniques ne représentaient que 1,8% seulement des gènes codants analysés.

Dans notre étude, les voies biologiques mises en évidence comme étant altérées via GSEA, présentent des groupes de gènes qui ne sont pas nécessairement différentiellement exprimés au regard de l'analyse réalisée avec Deseq2. Ces gènes peuvent être associés à des variations trop faibles par rapport au groupe témoin. Le fait de procéder à une analyse groupée par GSEA permet de faire ressortir de façon statistiquement significative des groupes de gènes, dont l'expression globale a été modulée par les expositions aux aérosols. Une analyse non-groupée, par exemple par RT-qPCR, n'aurait pas permis de montrer des effets ténus à l'échelle de gènes comparés individuellement. Cet outil a été nécessaire afin de mettre en lumière des effets subtils de doses faibles sur le SNC dont l'homéostasie est finement

régulée. Il est rétrospectivement dommage de ne pas avoir eu recours à l'analyse transcriptomique sur le cerveau des animaux adultes exposés plusieurs semaines, à l'instar des résultats produits sur le cerveau des souriceaux. Nous avons choisi de privilégier l'approche histologique, qui a nécessité un nombre suffisant d'animaux pour être mise en place, les effectifs d'animaux transgéniques étant restreints lors de cette étude.

1.4. Mesure du dépôt en titane et modélisation via MPPD

La quantification du titane pulmonaire s'est montrée être en accord avec l'estimation de la dose pulmonaire retenue chez les souris, ceci démontre la validité du modèle utilisé et la pertinence du choix des paramètres physiologiques d'entrée sélectionnés. De façon intéressante, nos résultats sont en accord avec ceux proposés par Koivisto et al. (2011). Ils ont utilisé un dispositif d'inhalation proche de nos exigences de caractérisation (Tableau 11) pour mesurer une fraction de dépôt pulmonaire en $nTiO_2$ de 8% chez la souris (6.8% dans notre étude), associé à un diamètre de mobilité électrique d'environ 80 nm (220 nm dans notre étude). Par ailleurs, malgré le fait que le titane n'ait pas été détecté dans le SNC des animaux adultes exposés, une fraction limitée des particules inhalées a toutefois pu y être transloquée. Il est possible qu'une concentration très faible de $nTiO_2$ se soit accumulée dans le cerveau des souris sans être mesurable par ICP-MS, dont la limite de détection est de l'ordre de 50 ng de titane/g de tissu (Krystek et al., 2014).

Concernant la modélisation des doses d'exposition, notons que les calculs ont été réalisés avec les paramètres physiologiques de la souche BALB/c, la lignée C57Bl/6J n'étant pas proposée dans le modèle MPPD. Néanmoins, certains auteurs n'ont observé aucune différence dans le dépôt pulmonaire de $nTiO_2$ entre les souches de souris BALB/c et C57Bl/6J exposées par inhalation (Koivisto et al., 2011), ce qui suggère une différence négligeable entre ces souches concernant le dépôt pulmonaire en particules. Il existe une incertitude inhérente à l'utilisation du modèle MPPD qui repose notamment sur le choix des paramètres utilisés dans le calcul de la dose déposée (paramètres ventilatoires, caractéristiques des particules etc.). La métrique utilisée pour procéder à l'extrapolation entre la souris et l'être humain (surface pulmonaire, masse pulmonaire ou poids corporel) influence également les résultats obtenus. Le choix de ces paramètres varie en fonction des différents auteurs, ce qui constitue une source de variabilité importante entre les études. À titre d'exemples, les volumes ventilatoires rapportés chez la souris varient de 150 à 300 µL (Hatch et al., 1984; Tankersley et al., 1994; Vinegar et al., 1979) tandis que la surface pulmonaire varient de 500 cm^2 (Stone et al., 1992) à 1600 cm^2 (Soutiere et al., 2004). Par ailleurs, le modèle MPPD est rigoureusement validé pour les particules solides et insolubles. Néanmoins, les particules comme le PQ peuvent posséder des propriétés hygroscopiques. Cette caractéristique implique un grossissement des particules par absorption de l'humidité ambiante, phénomène pouvant aussi avoir lieu à l'intérieur des voies respiratoires. En effet, le passage de l'air

inspiré dans les voies aériennes supérieures dont l'humidité relative avoisine les 100%, entraîne son réchauffement et sa saturation en vapeur d'eau (Asgharian, 2004). Cela peut modifier la valeur de la dose déposée, en provoquant l'augmentation rapide de la taille des particules inhalées. Une particule hygroscopique peut ainsi avoir un dépôt pulmonaire 2 à 4 fois plus faible qu'une particule insoluble de taille identique, en particulier pour les particules comprises entre 20 et 100 nm (Löndahl et al., 2007). Par conséquent, la dose déposée de PQ dans cette étude pourrait avoir été surévaluée par rapport à la masse réellement déposée, ce qui souligne d'autant plus le risque associé à son inhalation.

Grâce au dispositif mis en place et au suivi de la génération des aérosols, la méthode que nous avons utilisée a permis de mesurer avec précision la dose d'exposition des animaux. Nous pouvons donc faire le lien entre la concentration d'exposition, la dose inhalée, déposée, et la dose retenue, afin de valoriser les données produites, notamment par extrapolation à l'être humain. Nous avons choisi de réaliser cette extrapolation à partir de la dose déposée au niveau alvéolaire, car elle ne nécessite pas de modéliser la clairance au cours du temps. En effet, la clairance pulmonaire est très différente entre le rongeur et l'être humain (Oberdörster et al., 2005), ce qui ajoute un facteur de variabilité important. Elle varie en fonction du lieu de dépôt et elle est modulée par de nombreux facteurs spécifiques à l'espèce humaine (âge, pathologies, mode de vie etc.) non pris en compte dans les modèles actuels (Bos et al., 2019).

2. Quel bilan tirer de nos résultats ?

2.1. Un dispositif d'exposition aux aérosols en accord avec nos objectifs

Grâce à la caractérisation préalable des aérosols et des paramètres environnementaux auxquels sont soumis les animaux, nous proposons une chambre d'exposition qui est en phase avec les exigences nécessaires à l'élaboration des dispositifs d'inhalation chez le rongeur (cf. Chapitre 2, partie VI.2.1.), au regard de (1) l'homogénéité spatio-temporelle des aérosols générés, (2) la reproductibilité de la procédure de génération, (3) le suivi temporel du déroulement des expositions et (4) la nécessité de minimiser le stress induit par les expositions. Ainsi, ces éléments ont permis l'évaluation dosimétrique des expositions réalisées lors de la phase toxicologique, paramètre essentiel à prendre en compte pour assurer la comparaison inter-études. Lors de la mise en place de notre chambre d'exposition aux aérosols, les choix réalisés ont permis une génération aux concentrations cibles définies, de façon stable, dans une gamme de tailles particulaires submicrométriques. Le suivi métrologique des concentrations massiques et en nombre nous a permis de rendre compte précisément des doses d'exposition des souris. La cohérence entre les concentrations particulaires expérimentales et simulées a confirmé la pertinence des choix réalisés pour obtenir une homogénéité de l'atmosphère d'exposition. Les résultats ont montré la faisabilité de notre approche transdisciplinaire, qui s'est appuyée sur un ensemble de choix empiriques et rationnels afin de proposer un dispositif d'exposition validé sur le terrain. La mise en place de ce

dispositif modulable est une première étape méthodologique qui ouvre la voie à son utilisation dans d'autres études nanotoxicologiques. Par conséquent, nous considérons que ce dispositif proposé correspond aux exigences que nous avions établies préalablement à son développement.

2.1.1. Avantages du dispositif proposé

Le dispositif a été mis en place en portant une attention particulière aux différents éléments pouvant induire un stress animal. La méthode d'exposition corps entier nous a semblé la meilleure manière de minimiser les contraintes subies lors de l'exposition des animaux. Par exemple, le travail doctoral de (Bernal Meléndez, 2019) a estimé à une heure la durée optimale d'exposition chez le lapin, une espèce connue pour être sensible au stress. Leurs expositions ont été répétées plusieurs fois par jour afin de minimiser le stress induit par le dispositif d'exposition « nez seul ». En comparaison, un avantage majeur procuré par notre dispositif est sa capacité à exposer les animaux dans des conditions analogues à celles de leur hébergement habituel (liberté de mouvements, type de cage et environnement similaires). Cette méthode permet donc de procéder à des expositions sur des temporalités plus longues, compatibles avec celles nécessaires aux études de toxicité chronique (supérieures à 3 mois) sans craindre *a priori* l'apparition d'effets secondaires induits par le stress.

Notre dispositif est utilisable avec d'autres espèces de rongeurs. L'ajout de nourriture ou d'un enrichissement de l'environnement des animaux est envisageable. Il est possible par exemple de laisser les femelles disposer d'un nid pendant la période de l'allaitement. Dans les conditions de notre étude, seules des substances d'intérêt comportant une phase particulaire ont été utilisées. Cependant, le recours à phase gazeuse est possible. En outre, la simplicité et la modularité du dispositif permet d'envisager son utilisation dans d'autres scénarios expérimentaux, en proposant en amont une caractérisation minimale des aérosols d'exposition (distribution en taille, concentration massique et en nombre), ainsi que l'ajout d'éléments adaptés aux besoins de l'étude toxicologique désirée.

Un avantage notable réside dans la simplicité et la compacité du dispositif, qui peut être utilisé de façon routinière en animalerie sans nécessiter de suivi instrumental complexe ou d'un grand local dédié à son fonctionnement. Au sein de l'animalerie, notre cage de 20 L à l'encombrement faible pouvait être installée quotidiennement dans une pièce dédiée aux expérimentations. Ceci est un avantage majeur, en comparaison de certains dispositifs volumineux dépassant parfois les 1000 L (Bermudez et al., 2004; Sung et al., 2011), qui nécessitent une enceinte coûteuse et associée à un banc de caractérisation des aérosols contraignant pour contrôler l'homogénéité des atmosphères générés (système multi-instrumental, relevés toutes les heures des concentrations massiques etc.). Cette modalité d'exposition n'est par ailleurs pas forcément compatible avec l'expérimentation au long cours en animalerie confinée. Les dimensions réduites de notre enceinte d'exposition permettent son usage sous un poste de sécurité microbiologique si nécessaire, pour parer aux possibles contaminations issues de l'air extérieur, en

particulier dans le cadre de l'utilisation d'animaux au statut sanitaire contraignant (exempt d'organismes pathogènes spécifiques). Son faible encombrement permet également de l'utiliser sous une sorbonne, notamment lors de la manipulation d'animaux au pelage éventuellement contaminé, afin de minimiser les risques d'exposition de l'opérateur.

2.1.2. Limites du dispositif

Le manque de contrôle des voies d'exposition est l'inconvénient majeur inhérent aux dispositifs d'exposition corps entier. Cependant, dans une étude comme la nôtre, les composés employés sont décrits comme provoquant une absorption cutanée négligeable et une absorption intestinale très faible, celle du PQ ayant été estimée à 6% (Daniel and Gage, 1966b) et celle du $nTiO_2$ étant inférieure à 1% (Kreyling et al., 2017b). Par conséquent, la part attribuable à cette voie d'exposition peut être considérée comme faible en comparaison de l'exposition par la voie pulmonaire. De plus, ce sont des voies d'exposition tout à fait réalistes à étudier dans le cadre d'un scénario d'exposition agricole, qui peut impliquer à la fois une inhalation, un dépôt sur les habits et la peau, ainsi qu'un passage potentiel par voie orale. Dans les familles d'agriculteurs, les niveaux les plus élevés de résidus de pesticides sont notamment retrouvés dans les poussières de maison (Curl et al., 2002; Lu et al., 2000; Quandt et al., 2004), cette contamination étant susceptible de provoquer un dépôt sur les denrées alimentaires ou une exposition des enfants en bas-âge. À l'inverse, pour procéder à une exposition à des substances lipophiles, traversant facilement la barrière intestinale et cutanée, il conviendrait de prendre précisément en compte la contribution de chacune des voies d'exposition.

Si la température et le renouvellement d'air sont en adéquation avec les valeurs recommandées en animalerie, l'humidité dans la chambre d'exposition diffère néanmoins de celle recommandée pour les conditions d'hébergement des rongeurs. Cependant, certains auteurs ont montré qu'aucune influence sur la santé des rongeurs n'était causée par l'usage d'une humidité très faible (4% pendant 6h/j, durant 4 semaines) (Pauluhn and Mohr, 1999), suggérant une influence négligeable de ces conditions expérimentales déviant des normes recommandées. Notons également la quantité significative de substances nécessaires pour obtenir une concentration massique suffisante pour parvenir aux concentrations cibles (environ 1 g de $nTiO_2$ par session d'exposition). Par conséquent, ce mode d'exposition se prête mal à l'emploi de substances très coûteuses, ou disponibles en faible quantité.

L'utilisation d'une cage en polysulfone est un moyen simple et peu cher pour exposer les animaux. Toutefois, ce matériau non-conducteur pourrait constituer une source de pertes aux parois en cas d'accumulation de charges électriques à sa surface, par exemple à cause de son vieillissement. Pour pallier ce phénomène, le recours au remplacement de la cage peut être envisagé, notamment au regard du faible coût du matériel.

2.2. PQ et $nTiO_2$ ont un effet sur le cerveau fœtal, mais leur mélange a un effet plus faible

Au cours de ce travail doctoral, nous présentons pour la première fois des résultats d'une exposition par inhalation à un mélange de type NPe, ainsi qu'une exposition fœtale par inhalation au PQ. Il est important de noter que l'analyse transcriptomique permet de proposer des hypothèses quant aux dérégulations géniques observées, mais ne permet pas à elle seule d'établir les conséquences fonctionnelles sur le SNC des expositions aux aérosols. La modification de l'abondance des ARNm peut refléter à la fois un changement dans la composition des populations cellulaires et/ou de l'expression des gènes dans ces cellules. Toutefois, les résultats obtenus par cette méthode suggèrent clairement des altérations neurodéveloppementales au niveau du striatum des souriceaux au 14ème jour de vie post-natale. L'exposition gestationnelle aux aérosols d'intérêt a provoqué une dérégulation génique qui pourrait témoigner d'effets néfastes sur la mise en place et/ou le maintien du SNC au cours du développement.

L'exposition au PQ seul a provoqué la modification de l'expression de plusieurs marqueurs des cellules du SNC, une dérégulation des voies biologiques associées notamment à la myélinisation et la phosphorylation oxydative, et l'augmentation d'un marqueur pro-inflammatoire plasmatique. Ces résultats suggèrent des effets du PQ impliquant en particulier un stress oxydant et des dysfonctionnements mitochondriaux, processus dommageables à l'homéostasie neuronale, qui renvoient aux évènements moléculaires et cellulaires décrits dans l'étiologie de la MP. Concernant l'exposition au $nTiO_2$, nous avons observé une modification de l'expression d'un marqueur de la microglie, une altération des voies biologiques associées notamment à la myélinisation, la régulation des neurotransmetteurs et la production des signaux inflammatoires. L'exposition aux PQ + $nTiO_2$ n'a pas provoqué d'effet cocktail de type additif ou synergique. Au contraire, l'amplitude des modifications observées et le nombre de gènes différentiellement exprimés étaient inférieurs en comparaison des autres groupes, ce qui suggère une toxicité plus faible du mélange. À l'instar du groupe d'exposition au $nTiO_2$, nous avons observé une altération de la voie biologique associée à la régulation des neurotransmetteurs, dont l'amplitude était analogue entre ces deux groupes. En outre, l'exposition au mélange a provoqué des effets qui semblent avoir été induits par le $nTiO_2$ indépendamment du PQ. De surcroît, nous avons constaté une voie biologique dérégulée et commune aux trois groupes d'exposition, associée à la projection et la croissance neuronale.

2.2.1. Interprétation des résultats

Un lien peut être tissé entre les effets observés dans les groupes d'exposition, qui attestent globalement de perturbations de plusieurs types cellulaires du SNC. Au sein des groupes d'exposition

au PQ et au $nTiO_2$, certains indices ont suggéré la présence d'un état neuroinflammatoire chez les souriceaux. Bien qu'une induction de l'inflammation systémique n'ait pas été observée chez les animaux du groupe exposé au $nTiO_2$, l'expression d'un marqueur microglial et l'enrichissement de la voie biologique liée à la production des signaux inflammatoires suggèrent la présence possible d'un contexte neuroinflammatoire. La neuroinflammation est une réaction impliquée dans les pathologies neurodégénératives telles que la MP, elle est caractérisée par une activation des astrocytes et de la microglie, accompagnée de niveaux modérés de médiateurs inflammatoires mesurables dans le parenchyme cérébral (Ransohoff, 2016). Les astrocytes présentent un état activé à la suite d'effets neurotoxiques (Eng and Ghirnikar, 1994), menant au phénomène de l'astrogliose réactive qui est un processus associé à de très nombreuses neuropathies (infections virales, maladies neurodégénératives etc.). L'activation de ces cellules est corrélée avec une expression accrue de la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), qui a notamment été mise en évidence dans le groupe exposé au PQ. En sécrétant un ensemble de cytokines à la suite de leur activation, les astrocytes et les cellules microgliales occupent un rôle central dans l'homéostasie et les mécanismes de défense du SNC (Rostène et al., 2011). Il est néanmoins difficile d'établir si cette réaction est une cause de la neurotoxicité ou une conséquence de cette dernière. L'activation microgliale et astrocytaire est en effet un processus physiologique à double tranchant. D'une part, cette activation est nécessaire pour l'élimination des causes du signal inflammatoire (corps étranger, infection, débris cellulaire etc.), mais d'autre part elle contribue à une augmentation de la production d'ERO et de cytokines renforçant indirectement la neuroinflammation. Ce processus peut donc être un marqueur et/ou une cause possible de neurotoxicité au cours de notre étude.

La phosphorylation oxydative est fondamentale dans la maturation et la survie neuronale car elle fournit une source énergétique en continu aux cellules du SNC. L'altération de la fonction mitochondriale perturbe de nombreux aspects clés du neurodéveloppement, provoquant un développement anormal du cerveau et une baisse des capacités de renouvellement des cellules souches cérébrales (Khacho et al., 2017; Khacho and Slack, 2018) et sa perturbation peut prédisposer à une neurodégénérescence du cerveau adulte (Abou-Sleiman et al., 2006). De ce fait, la diminution de l'expression génique associée à cette fonction dans le groupe exposé au PQ peut être considérée à la fois comme un facteur de risque lié au développement d'une neuropathie telle que la MP, et comme une cause possible de retard neurodéveloppemental. Deux gènes clés de la MP ont été mis en évidence par l'analyse GSEA du groupe PQ : l'asyn (*Snca*) et la parkine (*Prkn*). La parkine est une enzyme connue pour jouer un rôle contre le stress cellulaire d'origine mitochondriale, en agissant comme un mécanisme de contrôle des composants mitochondriaux dysfonctionnels (Kuroda et al., 2012). L'asyn est principalement impliquée dans la plasticité synaptique et le trafic vésiculaire des neurotransmetteurs, et de plus en plus d'articles soulignent le lien entre cette protéine et la dysfonction mitochondriale au cours des maladies neurodégénératives (Rocha et al., 2018).

La myéline permet une conduction efficace de l'influx nerveux et elle assure la plasticité des circuits neuronaux. Elle est synthétisée par les oligodendrocytes au cours du processus de myélinisation des neurones qui a lieu à partir de la seconde semaine de vie post-natale chez le rongeur (Gumusoglu and Stevens, 2019). L'expression différentielle des gènes codant pour des constituants de la myéline est une caractéristique observée dans certaines pathologies psychiatriques, comme par exemple chez les enfants atteints d'autisme (Ginsberg et al., 2012). La perturbation de la myélinisation au cours du développement a été identifiée dans le cadre d'expositions prénatales par inhalation à des particules de la pollution atmosphérique chez la souris (Klocke et al., 2018). Les auteurs ont démontré une hypermyélinisation visible entre le 11ème et le 15ème jour de vie post-natale au niveau du cervelet et du corps calleux. Ils ont émis l'hypothèse que l'élévation anormale de la myéline au niveau de ces structures impliquées dans la motricité, pourrait se traduire plus tard par une altération des capacités de coordination motrice. La modification apparente du processus de la myélinisation provoquée par les aérosols pourrait donc avoir des effets à long terme, qui restent à évaluer. En particulier, le nombre d'oligodendrocytes, cellules qui expriment principalement les gènes associés à cette voie, pourrait avoir été modifié.

De façon similaire, la voie biologique associée à la croissance et aux projections neuronales a été trouvée enrichie dans les trois groupes d'exposition aux aérosols. *Rtn4r* est un gène différentiellement exprimé trouvé de façon commune dans les groupes d'exposition. Il est connu pour exercer un contrôle de la formation des neurites au cours du neurodéveloppement, son activation conduit notamment à l'inhibition de la croissance axonale (Hsu et al., 2007). Bien que les animaux exposés au mélange aient présenté un nombre moins important de groupes de gènes enrichis, le facteur de croissance Bdnf (*Brain-derived neurotrophic factor*), dont l'altération a été observée dans plusieurs maladies psychiatriques (Nieto et al., 2013), était surexprimé dans ce groupe d'exposition. Cette neurotrophine impliquée dans la régulation et la plasticité synaptique est un élément central du neurodéveloppement. Une étude plus poussée de l'évolution temporelle de ce facteur de croissance seraient donc nécessaire.

Les groupes d'exposition au $nTiO_2$ et aux PQ + $nTiO_2$ ont tous deux entraîné une surexpression de la voie associée à la régulation des niveaux de neurotransmetteurs. Plusieurs groupes de gènes liés à l'homéostasie ionique ont été trouvés enrichis, en lien avec les canaux ioniques assurant l'influx nerveux dans le SNC. Deux groupes de gènes codant des neurorécepteurs ont également été mis en évidence dans cette voie biologique : la régulation des récepteurs AMPA (*Regulation of AMPA receptor activity)* et la voie de signalisation des récepteurs du glutamate (*Glutamate receptor signaling pathway*). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur considéré comme jouant un rôle essentiel dans la mémoire à long terme, la plasticité synaptique et le développement cérébral. Néanmoins, une libération excessive et continue de glutamate peut entraîner un dysfonctionnement neuronal et des troubles neurodégénératifs, notamment mis en lumière dans la MP (Lau and Tymianski, 2010).

2.2.2. Mécanismes potentiels des effets observés

Il est possible que les toxiques inhalés, comme le $nTiO_2$ ou le PQ, puissent être transportés des voies respiratoires vers le fœtus pour y exercer un effet toxique *in situ* (Hougaard et al., 2015). Ainsi, le potentiel oxydant du PQ et du $nTiO_2$ pourrait être le mécanisme majeur de leur effet neurodéveloppemental, qui provoquerait la production d'ERO, altérant le statut oxydo-réducteur du cerveau en développement. À ce titre, le groupe d'exposition au PQ a présenté des altérations de gènes de l'homéostasie redox, avec deux gènes associés au stress oxydant différentiellement sous-exprimés : *Gclc* (*Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*) et *Gsr* (*Glutathione reductase, mitochondrial*) (Botta et al., 2004; Mora-Lorca et al., 2016). Ils sont tous les deux connus pour être impliqués dans l'équilibre oxydo-réducteur, en régulant la synthèse du glutathion dont la concentration est déterminante pour la défense antioxydante. Chez la femme enceinte exposée de façon répétée, le PQ est fortement suspecté de pouvoir traverser la barrière placentaire pour s'accumuler durant la gestation dans le fœtus (Konthonbut et al., 2018; Talbot et al., 1988; Tsatsakis et al., 1996). Ce phénomène a également été observé chez le rongeur exposé par voie intraveineuse, chez qui le PQ s'est accumulé au niveau placentaire et fœtal, en particulier dans le SNC (Ingebrigtsen et al., 1984). Une fraction du PQ a ainsi pu traverser la barrière placentaire pour exercer un effet oxydant directement sur le cerveau fœtal, ce qui a potentiellement provoqué les conséquences observées sur l'expression génique. À notre connaissance, aucune étude n'a mesuré le passage de PQ vers le fœtus lors d'une exposition par inhalation.

Concernant les NM non-solubles, une fraction peut être transférée du sang maternel vers le compartiment fœtal, cette voie privilégiant néanmoins les plus petites particules (Semmler-Behnke et al., 2008; Takahashi and Matsuoka, 1981). Les composés inhalés peuvent aussi exercer des effets toxiques à distance de leur cible toxicologique, sans avoir à passer préalablement les barrières biologiques. Certains auteurs ont observé des effets neurotoxiques (Jeon et al., 2011) ou neurodéveloppementaux (Hougaard et al., 2010) du $nTiO_2$ sans passage cérébral mesurable en ICP-MS. Ces effets indirects peuvent exercer une toxicité pour le développement du fœtus, même si les mécanismes en jeu sont encore méconnus (Hougaard et al., 2015). Ils pourraient notamment survenir par l'altération du fonctionnement placentaire et/ou par la production de médiateurs biochimiques libérés dans la circulation systémique en réponse à l'inflammation induite chez la mère (Gumusoglu and Stevens, 2019). En outre, une fraction des NM arrivant jusqu'au placenta par la circulation maternelle peut induire des altérations de la vascularisation placentaire (formation de thrombus, présence d'œdème vasculaire) menant au dysfonctionnement du placenta et à l'altération du développement du fœtus (Yamashita et al., 2011). Ces auteurs ont d'ailleurs montré que l'injection d'un anticoagulant pendant la gestation pouvait prévenir ce phénomène chez des souris ayant été exposées par voie intraveineuse

au $nTiO_2$. Il est donc à la fois possible qu'une faible part de $nTiO_2$ ait pu exercer un rôle direct sur le placenta ou sur le fœtus, tout en perturbant le neurodéveloppement via l'induction d'un effet inflammatoire maternel.

Même si les mécanismes exacts de l'action du $nTiO_2$ sur le neurodéveloppement sont encore mal compris, certains auteurs ont montré qu'il pouvait pénétrer dans les neurones en culture primaire et provoquer une inhibition de leur développement (Hong et al., 2018). Ils ont observé une altération des neurites, un dysfonctionnement du métabolisme de glutamate, et une modulation de l'activité des canaux calciques et potassiques voltage-dépendants, qui sont des voies biologiques également mises en lumière au cours de notre étude. Au sein de la littérature existante, il a aussi été observé que le $nTiO_2$ pouvait causer une altération de l'expression génique des cellules du striatum pendant la période prénatale chez la souris exposée par injection sous-cutanée (Shimizu et al., 2009). Ces effets ont été observés à plusieurs stades du développement jusqu'au 21ème jour de vie post-natale, ce qui montre la persistance des effets neurodéveloppementaux mesurés lors de cette étude. D'autres articles suggèrent que le stress pendant la vie fœtale induit par le $nTiO_2$ peut conduire à des modifications pérennes du neurodéveloppement, qui provoquent potentiellement des effets neurocomportementaux retardés, survenant à l'âge adulte. Hougaard et al. (2010) ont évalué les conséquences neurotoxiques de l'exposition de $nTiO_2$ par inhalation (42 mg/m^3) durant la gestation (1 h/jour, du 8ème au 18ème jour). À l'instar de notre étude, aucun effet n'a été observé sur les paramètres gestationnels. Malgré l'absence de titane détecté chez les souriceaux, les animaux ont présenté des modifications neurocomportementales une fois arrivés à l'âge adulte, sans modification significative de leurs capacités cognitives. Des modifications neurocomportementales ont aussi été observées à la suite d'une exposition prénatale au $nTiO_2$ chez le rat ayant atteint l'âge adulte (Cui et al., 2014).

Ces éléments montrent l'existence d'un lien entre une agression neurotoxique à un stade précoce et des conséquences ultérieures sur le SNC de l'individu adulte. Des auteurs ont mis en lumière que l'exposition prénatale peut exacerber la toxicité liée à une exposition ayant lieu plus tard au cours de la vie. Ce phénomène a notamment été observé par l'injection d'un mélange de PQ et de zinc, qui a provoqué une neurotoxicité accrue au stade adulte chez le rat préalablement exposé *in utero*, alors qu'une exposition seulement à l'âge adulte n'a pas suffi à induire des effets neurotoxiques (Mittra et al., 2020). Des résultats équivalents ont été obtenus lors de l'exposition précoce à une combinaison de PQ combiné au manèbe (fongicide) chez la souris, en ciblant spécifiquement les effets mesurés sur le striatum (Colle et al., 2020b). Ainsi, il est important de souligner l'effet de prédisposition des altérations neurodéveloppementales sur le potentiel neurotoxique d'une agression ultérieure au cours de la vie. Il ne faut donc pas négliger *a priori* des perturbations même mineurs du neurodéveloppement. Par conséquent, les perturbations du neurodéveloppement observées au cours de cette étude nécessiteraient une évaluation complémentaire sur le long terme, voire des effets transgénérationnels, afin d'évaluer les effets neurodégénératifs qui pourraient résulter de l'exposition précoce à ces aérosols.

2.2.3. Un effet diminué du mélange

L'effet réduit du mélange a été une surprise. Pourtant, quelques indices dans la littérature pourraient l'expliquer. Le potentiel oxydant du PQ et du $nTiO_2$ est reconnu comme le mécanisme majeur de leur effet cytotoxique car ces substances provoquent un déséquilibre oxydo-réducteur en augmentant la production des ERO. Un article récent a montré que la coexposition aux nanoparticules de silice et de magnétite provoque une diminution de la toxicité cellulaire associée à la baisse de leur pouvoir oxydant, en comparaison de l'exposition aux substances seules (Rafieepour et al., 2019). L'effet moins important de l'exposition au PQ + $nTiO_2$ pourrait donc être lié à la réduction du pouvoir oxydant du PQ et/ou du $nTiO_2$ en mélange. Pour tester cette hypothèse, nous avons procédé à des mesures de la toxicité cellulaire (cellules HEK 293T) des substances d'intérêt seules ou combinées (Annexe, Figure 1). Lors de la comparaison entre les cellules exposées aux substances seules ou en mélange, aucun effet statistiquement significatif n'a été observé sur la mortalité cellulaire. Nos résultats suggèrent plutôt un faible effet cocktail de type additif. En conséquence, ces données montrent qu'il n'y a pas d'effet clair du mélange sur le potentiel oxydant du PQ et du $nTiO_2$ en suspension.

Plusieurs études écotoxicologiques ont montré que le $nTiO_2$ en suspension peut diminuer la toxicité liée à la coexposition au chrome (Dalai et al., 2014), à l'argent, au cuivre (Rosenfeldt et al., 2014), à l'arsenic (Rosenfeldt et al., 2014; M. Yan et al., 2017) ou encore au cadmium (Tan et al., 2017; Yang et al., 2012). Cette diminution de la toxicité coïncide avec la baisse de leur biodisponibilité, en raison de leur adsorption sur le $nTiO_2$. À ce titre, Rosenfeldt et al. (2015) ont montré que la surface spécifique et la charge du $nTiO_2$ utilisé (P25 TiO_2) étaient deux éléments essentiels à cet effet de rétention des composés. Les auteurs ont par exemple montré que les ions Ag^+ étaient bien moins séquestrés que les ions Cu^{2+}, en lien avec le potentiel zêta négatif du $nTiO_2$, le potentiel zêta étant un indicateur de la valeur relative de la charge électrique des particules en suspension. Par conséquent, il est possible que la forme active toxique du PQ (PQ^{2+}) puisse être séquestrée par le $nTiO_2$ par adsorption à sa surface, de façon analogue au phénomène de type « cheval de Troie négatif » décrit par Naasz et al. (2018) (décrit dans le chapitre 1, partie II.4.2.).

Pour les raisons évoquées précédemment, nous pensons que l'interaction entre le PQ et le $nTiO_2$ peut modifier la toxicocinétique de cet herbicide, en modulant possiblement son passage placentaire. Cette hypothèse pourrait expliquer que le mélange n'ait pas induit d'effet toxique additif ou synergique, et la similarité des effets neurodéveloppementaux liés à l'exposition au PQ + $nTiO_2$ avec celle au $nTiO_2$ seul, plutôt qu'avec celle au PQ seul.

2.3. Quels effets sur la souris adulte ?

Nos données suggèrent que l'exposition au $nTiO_2$ provoque une neurotoxicité faible sur les voies dopaminergiques des animaux en absence de déficit moteur, caractérisée par la présence de variations significatives des niveaux des marqueurs des neurones dopaminergiques et de la microglie. Cet effet était moins marqué dans le groupe d'exposition exposé au mélange, malgré des signes de réactivité microgliale au niveau du striatum.

Contrairement à nos attentes, aucun effet clair n'a été observé sur les performances aux tests de motricité sur Rotarod, ce qui suggère qu'il n'y pas eu de déficit moteur induit par les aérosols d'intérêt. Le déclin des fonctions motrices étant lié à l'âge des animaux et à la durée des expositions, il est donc possible que ces résultats s'expliquent par le jeune âge des souris (exposées entre deux et quatre mois) associé à une durée d'exposition trop courte. Il est difficile de mettre ces résultats en lien avec la littérature existante, à cause du fait qu'il n'existe pas d'étude par inhalation réalisées avec cette lignée murine. Néanmoins, Naudet et al. (2017) ont procédé à des tests similaires sur Rotarod, effectués avec ce même modèle de souris exposées au PQ par la voie orale. Les auteurs n'ont pas observé d'altération des performances locomotrices au cours des 8 semaines de l'étude, ce qui soutient l'idée qu'une durée d'exposition plus longue serait pertinente à mettre en place.

Nos résultats confirment toutefois que les expositions mises en place ont eu un effet neurotoxique sur les animaux. Les données préliminaires issues de la quantification des immunomarquages dans les aires cérébrales d'intérêt, montrent la survenue d'une baisse du marquage de la TH dans le striatum des animaux traités avec l'aérosol de $nTiO_2$ pendant 7 semaines. La réduction de 45% du nombre de neurones dopaminergiques TH-positifs, pourrait ne pas avoir été suffisante pour induire une perte de la motricité. En effet, il a été décrit chez le rongeur un déficit moteur à la suite d'une baisse supérieure à 50% de ce marquage au niveau de la SN et du striatum (Lee et al., 1996). À l'inverse, certains auteurs ayant traité des souris au PQ ont observé une baisse dans le striatum de 20% à 30% de ce marqueur, sans perte de performances aux tests sur Rotarod (Colle et al., 2020). Par ailleurs, la détection de la réduction du nombre de neurones TH-positifs n'est pas une preuve suffisante pour affirmer que les neurones dopaminergiques sont effectivement morts à la suite des expositions (Breckenridge et al., 2013). Des tests complémentaires seraient nécessaires, comme l'utilisation de la colocalisation de la forme active de la caspase 3 avec un marquage TUNEL, pour confirmer l'induction d'une perte neuronale par apoptose (Endres et al., 2001).

Les marquages Iba-1 et GFAP ont été utilisés pour quantifier la réactivité microgliale et astrocytaire. Une réactivité microgliale a été mesurée au niveau du cortex et du striatum dans le groupe d'exposition au mélange, mais seulement au niveau cortical pour le groupe exposé au $nTiO_2$. De façon surprenante, aucun effet notable n'a été mis en lumière dans le groupe d'exposition au PQ concernant le marquage Iba-1, ce qui suggère que l'exposition au PQ seul n'a pas suffi à induire les effets observés lors de

l'exposition au mélange de PQ + $nTiO_2$. L'absence de signe visible sur les astrocytes pourrait à première vue être contradictoire. Cependant, le manque de données actuelles et le bruit de fond induit par l'usage de l'anticorps anti-GFAP rend la quantification problématique et ces résultats non définitifs.

Au cours de ce protocole, l'effet du mélange en comparaison des substances seules n'a pas induit d'effet cocktail, ce qui est cohérent avec nos conclusions issues des effets de l'exposition durant la gestation (étude NeuroDev).

2.3.1. Passage cérébral

La biodistribution des NM et leur translocation possible vers le SNC est un sujet central en nanotoxicologie, car les NM peuvent potentiellement traverser l'épithélium nasal par transcytose ou par les espaces intercellulaires, puis utiliser les voies nerveuses pour atteindre les régions profondes du cerveau (Lochhead et al., 2015). D'après les résultats de la modélisation via MPPD, la fraction de dépôt du $nTiO_2$ dans les voies aériennes supérieures (du nez au larynx) a été évaluée à 36% au cours de notre étude, ce qui correspond à une dose déposée de 253 µg par souris. Pourtant, le titane n'a pas été détecté dans le SNC par ICP-MS, ce qui suggère une absence d'accumulation cérébrale dans nos conditions expérimentales. Par ailleurs, nos résultats corroborent ceux obtenus par Disdier et al. (2017), ayant montré chez le rat exposé par inhalation (P25 $nTiO_2$, 6 h/jour, 4 semaines) un dépôt analogue dans les voies aériennes (35%), mais sans provoquer de translocation détectable au niveau cérébral.

Certains auteurs ont observé un passage cérébral de NM empruntant la muqueuse olfactive au cours d'expositions répétées par inhalation, pour le carbone (36 nm) (Oberdörster et al., 2004), le manganèse (30 nm) (Elder Alison et al., 2006) et l'iridium (20 nm) (Kreyling, 2016). Au cours de cette dernière étude, l'auteur a même observé que l'accumulation cérébrale d'iridium était huit fois plus importante via le passage depuis les voies aériennes supérieures que depuis les poumons. Ces études suggèrent donc un passage cérébral privilégié des NM inhalées à travers la muqueuse nasale plutôt qu'au travers de la BHE depuis la circulation générale. Néanmoins, ces mécanismes ont été décrits pour des NM de taille faible, inférieure à celle utilisée au cours de notre étude. En outre, le diamètre moyen des axones des neurones olfactifs au sein desquels seraient transportés les NM, a été décrit comme étant compris entre 80 et 140 nm pour une souris adulte (Watanabe et al., 2007), ce qui exclurait en conséquence les agglomérats et les agrégats supérieurs à cette gamme de tailles.

Le passage des particules via la muqueuse nasale pourrait cependant avoir lieu sous une forme désagrégée. Jusqu'à présent, la question de l'importance du phénomène de désagglomération *in situ* des NM déposés fait encore l'objet de débats (Bierkandt et al., 2018) car les propriétés physico-chimiques propres à chaque NM induisent des réponses biologiques spécifiques et difficiles à comparer. Toutefois, il est reconnu que les particules de petite taille peuvent résider dans la cavité nasale plus longtemps

(Cunha et al., 2017) et que les mécanismes en jeu dans leur transport intracellulaire privilégient les petites particules chargées positivement (Crowe et al., 2018; Khan et al., 2019). À l'inverse, la valeur du potentiel zêta du P25 $nTiO_2$ est négative dans l'eau (- 22 mV, pH 7,4)(Gerloff et al., 2012) ainsi qu'en milieu de culture (- 33 mV, pH 7,5 milieu DMEM + 10% FBS) (Kose et al., 2020), ce qui peut expliquer l'incapacité du $nTiO_2$ à pénétrer via la muqueuse nasale sous une forme désagglomérée. À ce titre, certains auteurs ont démontré que le surfactant pulmonaire, à la composition similaire de celle du mucus nasal, ne favorise pas la désagrégation des agglomérats et des agrégats de $nTiO_2$ (Maier et al., 2006). Par conséquent, nous posons l'hypothèse que les particules de $nTiO_2$ ont été déposées dans la cavité nasale sous une forme agglomérée ne permettant pas, ou très peu, leur passage par le biais de la voie olfactive, expliquant ainsi l'absence de titane mesuré au niveau cérébral.

Un passage cérébral du PQ peut avoir eu lieu, mais sans être nécessairement bioaccumulé au cours du temps. Anderson et al. (2021) ont récemment montré un passage cérébral chez des souris exposées au PQ par inhalation (130 µg/m³, 4h/jour pendant 4 semaines). Leurs données suggèrent une élimination plus lente dans le striatum que dans les autres aires du SNC, mais ils n'ont pas été en mesure d'évaluer la demi-vie cérébrale précise du PQ. Elle était de l'ordre de quelques jours, ce qui est plus court que la demi-vie de 28 jours couramment admise et évaluée chez le rongeur par Prasaad et al. (2008, 2009) en utilisant des injections massives de PQ. Une équipe de chercheurs a récemment décrit la toxicocinétique du PQ chez plusieurs espèces en utilisant un modèle pharmacocinétique physiologique (PBPK) (Campbell et al., 2021). Ils ont montré l'existence d'une cinétique d'élimination cérébrale spécifique à l'exposition aux doses importantes, comme dans le cas de l'exposition par injection, qui provoque une élimination cérébrale lente due à une pénétration tissulaire profonde. Par conséquent, la différence entre les demi-vies mesurées entre ces études pourrait s'expliquer par une cinétique cérébrale distincte en fonction de la méthode d'exposition employée, l'injection massive de PQ privilégiant une accumulation tissulaire au détriment des capacités d'élimination de l'organisme, ce qui ne reflète pas un scénario d'exposition chronique.

2.3.2. Dépôt inférieur du mélange

De façon surprenante, la concentration en titane dans les poumons du groupe exposé au PQ + $nTiO_2$ est inférieure à celle du groupe exposé au $nTiO_2$ seul. Au vu du suivi métrologique des concentrations en aérosols, cette différence ne provient pas de concentrations d'exposition distinctes. À notre connaissance, peu d'études rendent compte des effets de l'inhalation de mélanges impliquant des NM. Un article récent a néanmoins décrit des différences dans la rétention pulmonaire de nano-objets d'argent et d'or chez le rat exposé 28 jours par inhalation (Kim et al., 2021). L'exposition au mélange de ces deux NM a provoqué une diminution plus rapide de la concentration en argent dans les poumons, en comparaison de l'exposition aux nano-objets d'argent seuls. Le mécanisme serait lié à une dissolution

de l'argent sous forme ionique, phénomène qui n'est toutefois pas applicable au $nTiO_2$, décrit comme ne pouvant pas se dissoudre *in situ* (Brun et al., 2014; Soto-Alvaredo et al., 2014). Les interactions électrostatiques des NM avec des composés chimiques organiques ont été rapportées comme affectant leurs propriétés physico-chimiques et leur toxicité, en particulier par l'impact sur la composition de leur corona (Jiang et al., 2009; K. Yang et al., 2009). La dose déposée dans les différentes zones de l'arbre respiratoire estimée via MPPD est semblable entre les deux groupes d'exposition au TiO_2 (seul ou en mélange), mais ce modèle ne permet pas de prendre en compte la charge électrique des aérosols pour étudier cette hypothèse, ce qui montre les limites de son utilisation. Par conséquent, plusieurs explications peuvent être invoquées pour expliquer que la clairance et la biodistribution du $nTiO_2$ puissent être modifiées par la présence du PQ.

Le phénomène de dépôt dans les voies respiratoires fait intervenir la sédimentation (pour les plus grosses particules), la diffusion (pour les plus petites), et la précipitation électrostatique (pour les particules chargées électriquement). Comme les distributions granulométriques des deux aérosols de $nTiO_2$ (seul ou en mélange) sont similaires, le dépôt de l'aérosol de PQ + $nTiO_2$ dans les voies aériennes pourrait être modifié par la charge électrique des particules. À ce titre, Koullapis et al. (2016) ont démontré un dépôt privilégié dans les voies aériennes supérieures (jusqu'à 7 fois supérieur) des particules chargées par rapport à celles électriquement neutres, en particulier pour les particules les moins soumises au dépôt par sédimentation (< 2.5 µm). En tant que substance cationique, le PQ pourrait moduler la charge électrique de surface du $nTiO_2$ et donc son lieu de dépôt dans les voies aériennes. Un lieu de dépôt préférentiellement proximale, au sein des voies aériennes supérieures et de l'arbre trachéo-bronchique, pourrait avoir diminué la bioaccumulation pulmonaire du mélange.

Par ailleurs, il a été montré qu'une charge de surface négative réduit l'absorption et l'internalisation du $nTiO_2$ par l'épithélium bronchique (Vranic et al., 2017). Nous avions évoqué dans la section introductive le rôle central de la corona dans les effets décrits des NM (Chapitre 1, partie II.2.3.4.). À ce titre, la capacité d'adsorption du PQ sur le $nTiO_2$ est reconnue pour être élevée (Florêncio et al., 2004; Vohra and Tanaka, 2003), ce qui provoque une couverture de surface importante du $nTiO_2$. Le P25 $nTiO_2$ a été décrit comme s'agglomérant rapidement dans les poumons au contact du surfactant (Creutzenberg et al., 2012), cet état d'agglomération jouant un rôle important dans sa bioaccumulation. Le devenir biologique du $nTiO_2$ pourrait donc être affecté par la présence du PQ à sa surface, modulant sa charge de surface, son état d'agglomération, son internalisation cellulaire et sa biodistribution.

XII. Perspectives

1. Quelles analyses ?

L'analyse neurodéveloppementale a été réalisée sur une seule aire cérébrale à un temps donné, ce qui ne permet pas d'étudier l'évolution temporelle des altérations observées et d'estimer leurs conséquences chez l'animal adulte. Pour déterminer les mécanismes en jeu dans les effets différentiels des substances en mélange, il serait nécessaire de faire le lien entre les perturbations géniques, l'analyse histologique du SNC, et les atteintes neurocomportementales à différents stades de la vie. Ceci afin de pouvoir déterminer si les dérégulations géniques mises en lumière correspondent seulement à une réponse adaptative, ou bien à des effets toxiques fonctionnels et/ou lésionnels, constituant des altérations précoces qui prédisposeraient les animaux au développement d'une neuropathie.

Pour étudier la relation dose-réponse, il conviendrait également d'utiliser plusieurs concentrations de PQ et de $nTiO_2$ tout en considérant une temporalité d'exposition plus étendue, par exemple en commençant les expositions le premier jour de la gestation, voire en amont de la fécondation. Il paraît en effet improbable qu'une personne soit exposée seulement durant la grossesse à un polluant. Il conviendrait aussi de prendre en compte la période de l'allaitement, qui est importante du fait que les toxiques peuvent être transmis à la descendance par cette voie peu étudiée, en jouant un rôle sur le développement (Cai et al., 2019). Le dispositif proposé s'y prête particulièrement, en permettant d'exposer plusieurs espèces d'animaux dans des conditions quasiment identiques à celles utilisées pour leur hébergement.

Nos données suggèrent une incidence directe des aérosols sur le cerveau adulte, et potentiellement sur le placenta et le cerveau en développement des souriceaux. Il conviendrait de déterminer selon quelle cinétique se fait la distribution des particules au sein de l'organisme des modèles murins utilisés et par quels mécanismes d'internalisation. Une exposition à des particules de $nTiO_2$ d'une granulométrie différente permettrait de vérifier si l'existence d'un passage par la muqueuse olfactive est conditionnée par la taille des particules déposées. Le prélèvement d'autres tissus (placenta) et matrices biologiques (urine, lait, sang maternel) pourrait contribuer à expliquer les mécanismes d'action des toxiques mis en jeu. De plus, les échantillons biologiques collectés tout au long de cette étude, pourraient permettre une quantification des substances d'intérêt *in situ* pour analyser la distribution dans les autres organes susceptibles d'avoir accumulé les substances d'intérêt (le foie, les reins, etc.).

La toxicité du mélange PQ + $nTiO_2$ paraissant diminuée en comparaison des substances seules, il serait nécessaire de procéder à une exploration approfondie des mécanismes impliqués dans l'interaction de ces composés en phase aérosol. De façon complémentaire, des analyses supplémentaires en microscopie électronique offriraient l'opportunité de caractériser la nature de l'interaction entre le $nTiO_2$ et le PQ. Par ailleurs, une quantification par immunohistochimie des macrophages alvéolaires et des

marqueurs de fibrose sur les coupes de poumons prélevés permettrait de comparer l'inflammation pulmonaire associée à chacun de nos aérosols d'intérêt pour évaluer leur toxicité sur cet organe.

Le pan associé aux analyses histologiques est encore parcellaire, une analyse plus détaillée des échantillons biologiques permettra d'approfondir l'étude de la neurotoxicité chez l'animal adulte prédisposé à développer une maladie neurodégénérative. Il conviendrait de procéder à la recherche de la forme de l'asyn phosphorylée dans les SNC des animaux, afin d'étudier la relation entre la durée d'exposition aux aérosols et la progression des marqueurs spécifiques de la maladie. En outre, la quantification du titane dans les intestins permettrait d'étudier le phénomène de redistribution des particules vers le tractus digestif à la suite de leur inhalation, afin d'étudier l'effet du mélange sur la biodistribution du $nTiO_2$.

2. Quel avenir pour le dispositif ?

Ce travail de thèse renforce l'idée qu'il existe un risque sanitaire associé à l'exposition par inhalation aux pesticides et aux NM à des niveaux d'exposition considérés comme sans danger au regard des recommandations actuelles. Il constitue donc un argument supplémentaire devant motiver la mise en place d'autres études toxicologiques visant à renseigner les effets des mélanges de substances auxquelles chacun peut être exposé quotidiennement. Cette démarche s'inscrit dans la volonté d'évaluer les impacts sanitaires de la qualité de l'air, en particulier au cours des phases critiques telles que le neurodéveloppement, en proposant des protocoles qui soit harmonisés et reproductibles entre laboratoires pour produire des données transposables à l'homme.

Ce travail présente une méthode permettant l'étude toxicologique de substances diverses grâce à la mise en place aisée d'un dispositif en animalerie, facilement transposable au sein de protocoles expérimentaux variés. L'aspect simple et modulaire du dispositif proposé, permet d'envisager son utilisation dans d'autres scénarios expérimentaux, en réalisant en amont une caractérisation minimale des aérosols d'exposition (distribution en taille, concentration massique et en nombre), ainsi que l'ajout d'éléments adaptés si nécessaire, tels qu'un humidificateur d'air pour parvenir à une humidité plus en phase avec la réglementation actuelle. De façon complémentaire, il est possible d'utiliser un neutraliseur d'aérosol, pour fournir une distribution de charge contrôlée aux particules générées (Adamcakova-Dodd et al., 2015; Koivisto et al., 2011; Okada et al., 2019) et prévenir les phénomènes électrostatiques pouvant nuire à la qualité de l'étude (dépôt aux parois, dans les voies aériennes supérieures). Un compresseur plus puissant permettrait également d'augmenter le débit en air fourni au système, pour permettre l'utilisation de plusieurs cages d'exposition en même temps, en particulier pour inclure un groupe témoin non traité mais exposé à l'air filtré. Il pourrait aussi être judicieux de mettre en place un

protocole utilisant plusieurs cages d'exposition de façon concomitante afin de réduire le temps nécessaire à la réalisation de l'étude.

XIII. Conclusion

Ce travail doctoral témoigne de l'intérêt de conjuguer des approches scientifiques complémentaires autour d'un projet de recherche commun, afin d'amener différents acteurs à travailler ensemble sur des problématiques sanitaires transdisciplinaires. En conclusion, après avoir illustré le problème sanitaire soulevé par l'usage des NPe et de leurs effets potentiels par inhalation sur le cerveau, nous avons identifié une méthode pour caractériser le fonctionnement d'un dispositif d'exposition aux aérosols au vu du paysage scientifique et réglementaire actuel. Les propriétés principales de notre démarche sont les suivantes : une caractérisation précise en laboratoire métrologique associée aux exigences essentielles à l'étude en nanotoxicologie, suivie d'une validation sur le terrain en utilisant deux métriques moins contraignantes pour suivre les expositions *in vivo*. La finalité de cette méthode est l'obtention de résultats reproductibles et transposables entre les espèces en utilisant une dosimétrie caractérisée, afin de répondre aux besoins de l'évaluation du risque sanitaire.

Nous avons étudié l'applicabilité de notre stratégie expérimentale au cas de l'évaluation des effets neurotoxiques d'un aérosol modèle de paraquat et de nano-objets de TiO_2. Les données produites chez l'animal adulte prédisposé au développement d'une synucléinopathie, ont montré que l'exposition au $nTiO_2$ provoque une neurotoxicité faible sur les voies dopaminergiques des animaux en absence de déficit moteur. Parallèlement, l'analyse du transcriptome du striatum s'est avérée être une technique particulièrement sensible pour détecter la signature génique associée aux effets neurodéveloppementaux des expositions prénatales à nos aérosols d'intérêt. Nous présentons les résultats d'expériences effectuées sur des animaux exposés durant la gestation à des doses considérées comme faibles, théoriquement sans effet toxique. Pourtant, les résultats obtenus ont permis d'identifier des altérations géniques induites par l'exposition *in utero* aux aérosols, qui témoignent d'effets neurodéveloppementaux dont les conséquences sur l'homéostasie cérébrale au long terme restent à éclaircir. Nos observations confortent l'idée que le PQ et le $nTiO_2$ ont tous deux une influence préoccupante sur le cerveau en développement. Ces données confirment que la phase prénatale doit être considérée comme une fenêtre critique pour le neurodéveloppement, nécessitant de donner une priorité à l'évaluation des effets de l'exposition par inhalation chez la femme enceinte. Pourtant, la majeure partie des valeurs toxicologiques de référence disponibles pour l'évaluation sanitaire des pesticides, repose sur des études réalisées via la voie orale, ce qui nécessite donc une production de données issues d'études par inhalation.

Bien qu'aucun effet synergique n'ait été observé, le risque sanitaire des mélanges au sein des NPe comme celui des nano-objets de TiO_2 et du PQ, ne peut pas être analysé en considérant la toxicité de chaque substance prise séparément. Il apparaît en effet des phénomènes d'interaction existant entre ces deux composés, qui peuvent moduler leurs effets toxicologiques.

Annexes

Résultats complémentaires

Tableau S1. Échantillons histologiques disponibles pour l'analyse immunohistochimique (projet NeuroTox).

Groupe exposition	PQ			nTiO2			PQ + nTiO2		
Aire cérébrale	**S4**	**S5**	**S7**	**S4**	**S5**	**S7**	**S4**	**S5**	**S7**
BO	4	5	**3**	5	**3**	**0**	5	6	6
St	4	**1**	**3**	**0**	**1**	6	6	6	4
Cx	5	6	6	6	6	6	6	6	6
Hip	5	**3**	**0**	**4**	5	**0**	6	5	6
Th	5	5	**0**	**3**	6	**0**	6	6	6
Mes	5	5	6	**4**	**2**	6	6	6	6
Tc	**2**	4	6	5	6	6	6	6	6
Ct	5	6	6	6	6	6	6	6	**3**

Échantillons disponibles au moment de l'analyse présentée dans ce manuscrit. Nombre d'individus présentés pour chaque groupe d'exposition aux aérosols, en fonction du nombre de semaines d'exposition (S), chaque groupe mis à mort étant composé au total de 6 individus. Les analyses statistiques ont été réalisées lorsqu'au minimum 4 échantillons/groupe étaient disponibles, les groupes colorés en rouge n'ont pas été analysés. Le groupe contrôle possédait un nombre supérieur d'échantillons biologiques (N≥10).

Tableau S2. Poids des organes des animaux mis à mort à la 7ème semaine (projet NeuroTox)

Aérosol		Contrôle	PQ	$nTiO_2$	PQ + $nTiO_2$
Poids corporel (g)		20,5 ± 1,7	21,6 ± 1,8	19,9 ± 1,4	19,2 ± 1,8
Poids organes (mg)	Foie	852 ± 141	991 ± 173	962 ± 113	899 ± 127
	Poumons	128 ± 21	158 ± 35	140 ± 22	129 ± 27
	SNC	427 ± 16	438 ± 25	411 ± 12	421 ± 15
	Reins	206 ± 22	246 ± 18	209 ± 19	213 ± 16
	Rate	53 ± 22	66 ± 22	54 ± 22	52 ± 22
	Yeux	47 ± 2	50 ± 4	46 ± 3	45 ± 4

Poids des organes des animaux à l'issue des 7 semaines d'expositions, prélevés à des fins de quantification *in situ* des substances d'intérêt (N=6 par groupe).

Test de toxicité cellulaire des substances d'intérêt seules ou en mélange

Méthodes

Les cellules HEK 293T (lignée rénale humaine embryonnaire) ont été cultivées dans un milieu DMEM Glutamax complémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et un mélange de pénicilline-streptomycine à 100 µg/mL à 37°C et sous 5% de CO_2. Le test de toxicité est réalisé grâce au kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay de Promega®. Cette méthode repose sur la mesure des concentrations en ATP intracellulaire, grâce à la luciférase par la réaction suivante :

ATP + d-Luciferine + O_2 → Oxyluciferine + AMP + Pyrophosphate + CO_2 + λ (560nm)

C'est une méthode sensible et rapide pour déterminer la concentration en ATP dans le milieu, qui est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes, car la mort cellulaire provoque un relargage d'ATPases. Des plaques de 96 puits ont été ensemencées sur une nuit (20 000 cellules), le milieu a été remplacé le lendemain par 100 µl de milieu de culture contenant les substances d'intérêt (PQ, $nTiO_2$ ou PQ + $nTiO_2$) utilisées pour préparer les suspensions colloïdales nébulisées lors de l'étude nanotoxicologique. Un témoin traité seulement avec le milieu de culture a été utilisé comme référence. La lecture de la toxicité se fait grâce au kit CellTiter-Glo de Promega®. Le milieu a été retiré puis 90 µl

de DMEM Glutamax ont été ajoutés. Après 30 min à température ambiante, 90 µl de réactif Cell-Titer Glo ont été ajoutés et la luminescence a été mesurée dans chacun des puits préparés en triplicat (lecture de l'absorbance à 560 nm).

Résultats

Une diminution de la viabilité cellulaire de 5%, 11% et 6% a été mesurée respectivement pour les concentrations 0,1 mM PQ + 50 mg/TiO_2, 0,1 mM PQ + 25 mg/TiO_2 et 0,1 mM PQ + 12,5 mg/TiO_2 en comparaison des concentrations équivalentes en $nTiO_2$ mais sans PQ. En comparaison, la diminution de viabilité est de 10% à la concentration de 0,1 mM en PQ seul. Aucun effet statistiquement significatif n'a été mis en évidence lors de la comparaison des moyennes obtenues entre le groupe traité avec le mélange et ceux exposés aux substances seules aux concentrations équivalentes. Par conséquent, la tendance observée concernant l'effet des substances en mélange suggère un faible effet cocktail de type additif sur le modèle cellulaire utilisé.

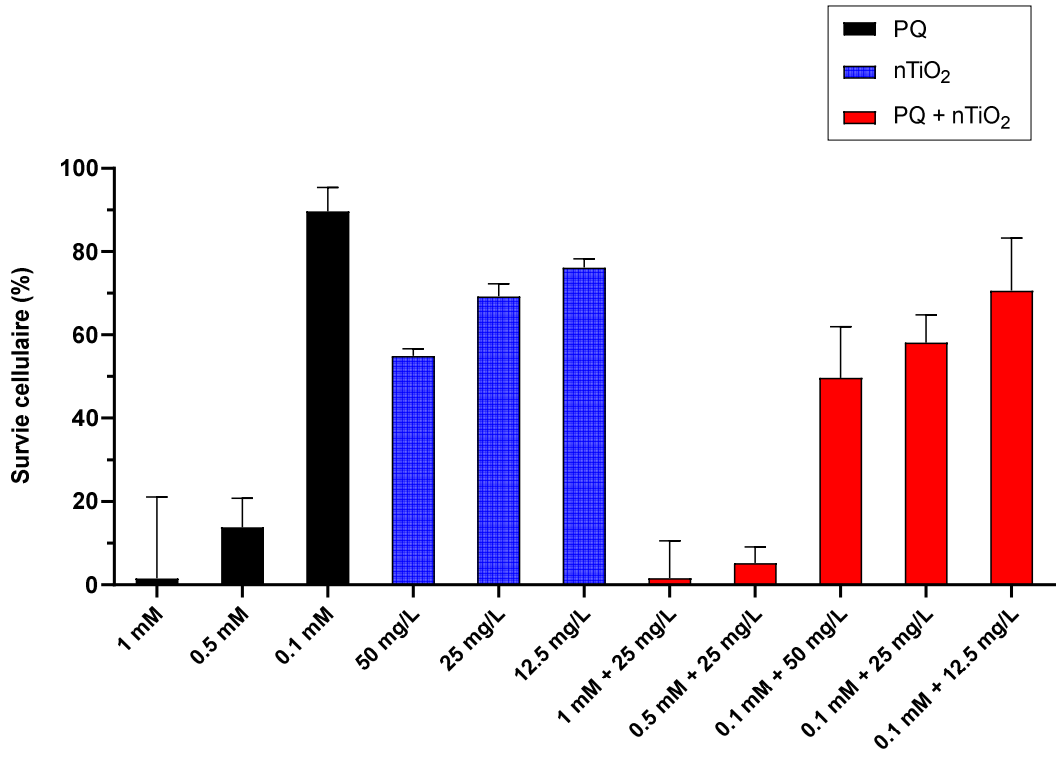


Figure annexe 1. Test de viabilité cellulaire, réalisé en utilisant 3 concentrations en PQ et en $nTiO_2$ seuls ou en mélange. Résultats présentés sous la forme de survie relative moyenne par rapport au groupe témoin (traité au milieu de culture) ± écart-type. Test statistique utilisé : analyse de variance à deux facteurs (ANOVA, grâce au logiciel Prism 8.0), seuil de significativité de 5%.

Saisine du comité éthique

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR,
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Paris, le 29 juin 2019

Objet : Notification de décision relative à l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Direction générale de la recherche et de l'innovation

Service de la performance, du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche

Département des pratiques de recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des Fins Scientifiques - AFiS -

Affaire suivie par
Véronique Delassault
Responsable administrative de la cellule AFiS

Tél : 01 55 55 97 27
veronique.delassault
@recherche.gouv.fr

autorisation-projet
@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#21139-2019061216176856 v3
- ayant pour titre : Etude in vivo de l'impact neurotoxique de l'exposition par inhalation aux aérosols de pesticides innovants nano-additivés
- déposé par l'établissement utilisateur : Plateau De Biologie Expérimentale (Pbes) - Ecole Normale Supérieure De Lyon, numéro d'agrément C691230303, dont le responsable est Monsieur Jean-François PINTON,
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par : Madame Anna BENCSIK, Monsieur Frédéric FLAMANT,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement utilisateur, pour une durée de 5 ans à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°015 et a reçu un avis favorable.

Ce projet ne fera pas l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective.

Pour la ministre et par délégation
l'adjoint au chef du service de la performance,
du financement et de la contractualisation
avec les organismes de recherche

Damien ROUSSET

Monsieur Jean-François PINTON
Plateau De Biologie Expérimentale (Pbes) - Ecole Normale Supérieure De Lyon

Valorisation de la thèse

Articles publiés dans une revue à comité de lecture international

- Article métrologique (*Aerosol and Air Quality Research,* https://doi.org/10.4209/aaqr.200626):

Metrological characterization of an aerosol exposure chamber to explore the inhalation effects of the combination of paraquat and TiO_2 nano-objects

Quentin Hamdaoui, Anna Bencsik, Frédéric Flamant, Simon Delcour, Tatiana Macé, Sophie Vaslin-Reimann, François Gaie-Levrel

- Article toxicologique (*Chemosphere*, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132253):

Prenatal exposure to paraquat and nanoscaled TiO_2 aerosols alters the gene expression of the developing brain

Quentin Hamdaoui, Yanis Zekri, Sabine Richard, Denise Aubert, Romain Guyot, Suzy Markossian, Karine Gauthier, François Gaie-Levrel, Anna Bencsik, Frédéric Flamant

Autres publications

- Conference paper 01/2019 (DOI: 10.1051/metrology/201907002):

Development and metrological characterization of an aerosol generation device dedicated to inhalation toxicology studies: the nanopesticide case

Quentin Hamdaoui, François Gaie-Levrel, Tatiana Macé, Sophie Vaslin-Reimann, Frédéric Flamant, Anna Bencsik

Participation aux congrès internationaux :

- Poster présenté au congrès européen sur les aérosols (EAC 2019, Göteborg, Suède):

Development of an aerosol exposure chamber for inhalation toxicology studies: Focus on the nanopesticide case

Quentin Hamdaoui, François Gaie-Levrel, Frédéric Flamant, Anna Bencsik

- Présentation orale du pan métrologique du doctorat au Congrès international de Métrologie (CIM 2019, Paris).

Participation aux congrès nationaux :

- Présentation orale du projet de thèse et des résultats préliminaire au « GIENS » 2018 (Groupe Interdisciplinaire pour l'étude des Effets environnementaux des NanotechnologieS).

Communications orales internes :

- *IGFL meetings post-talks* (Février 2020)
- *IGFL internal seminar* (Mai 2020)
- LNE séminaire R&D (Janvier 2021)

19th International Congress of Metrology, 07002 (2019) https://doi.org/10.1051/metrology/201907002

Development and metrological characterization of an aerosol generation device dedicated to inhalation toxicology studies: the nanopesticide case

Quentin Hamdaoui[1], *François* Gaie-Levrel[1], *Tatiana* Macé[1], *Sophie* Vaslin-Reimann[1], *Frédéric* Flamant[2], *and Anna* Bencsik[3]

[1]Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE), 1 rue Gaston Boissier, 75724 Paris Cedex 15, France
[2]Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), 32-34 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon Cedex 07, France
[3]Université Lyon 1 - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon, France

Abstract. Despite the controversies surrounding the potential health effects associated with engineered nanomaterials, novel agrochemicals combining nanotechnology and pesticides are emerging. These products, named nanopesticides, are being developed to improve the efficiency of conventional agrochemicals. However, they represent an intentional anthropogenic source of nanomaterials within the different environmental compartments which constitutes a possible exposure of agricultural populations notably via the aerosols generated by farming activities. The hazard related to this new type of contaminants must be assessed by using inhalation toxicology studies that are designed to reproduce the complexity of these aerosols exposure, in order to be relevant for human health studies. In the present article, we report an experimental strategy combining both the recommendations in animal experimentation and the OECD guidelines for chemicals testing. To explore the neurotoxicity linked with the chronic exposure to aerosols generated from a nanopesticide, we develop an original device dedicated to inhalation toxicology with rodents. Through this proof of concept study, our cross-disciplinary project aims at proposing a validated methodology to study the inhalation toxicity of complex formulations represented by nanopesticides.

1 Introduction

In response to the worldwide growing demand for food, nanotechnology applications in agriculture elicit a particular interest. A wide range of novel products called nanopesticides (NPEs) are emerging on the market [1] thanks to engineered nanomaterials (ENMs) used either as active ingredients or additives [2]. Due to unique properties granted by their nanometric scale, these new products would theoretically benefit from enhanced efficiency compared to conventional pesticides while mitigating the principal drawbacks associated with the exposure of non-target organisms. They aim at responding to the weaknesses of current plant protection products mostly by alleviating the environmental footprint of modern agriculture which is one of the main sources of ecosystem contaminations. As the fate of NPEs is still poorly understood, they have been integrated as a priority by various regulatory bodies and research funding agencies such as the USDA [3]. The use of NPEs could result ultimately in intentional and diffuse inputs of ENMs into the environment, which is a topic of great concern. Inhalation is often considered as the most likely exposure pathway for professionals handling aerosolizable ENMs. Accordingly, agricultural populations may be specifically exposed through inhalation especially because of the spray drift hazard. However, studies on the potential impact of chronic exposure to NPEs via inhalation are almost inexistent and they mainly rely on *in vivo* assays. Moreover, such studies are rarely in accordance with the OECD guidelines for the testing of chemicals [4].

The aerosol exposure device presented in this paper is dedicated to whole-body inhalation studies with rodents. Considering the important need for harmonizing the procedures for aerosols characterization, specific cares were taken to make a compromise between OECD guidelines for chemical testing [4] and the necessary conditions to be hosted in any animal facility. It has been designed to conform to standard features: (1) to comply with ethics and hosting parameters in accordance with animal welfare; (2) to enable an estimation of the dosimetry by generating stable aerosols for two hours; (3) to optimize the repeatability and the reproducibility of the measured parameters in accordance with the ISO 5725-2 standard [5]; (4) to deliver an homogeneous test atmosphere in the exposure chamber; (5) to protect operators from ENM. The whole-body exposure appears to be the most realistic and accurate way to expose rodents chronically to an aerosol by enabling animals to behave naturally during the exposure phases. In order to manage the upcoming toxicology study, this *ad hoc* device has been characterized with a toxicological model

* Corresponding author: quentin.hamdaoui@ens-lyon.fr

© The Authors, published by EDP Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

19th International Congress of Metrology, 07002 (2019) https://doi.org/10.1051/metrology/201907002

of NPE composed of nano-TiO_2 P25 and paraquat (PQ) which is the active ingredient of a widely used herbicide.

According to the actual data on the production and the life cycle of the main ENMs in European Union, the environmental contamination by nano-TiO_2 is expected to be important [6]. Nano-TiO_2 has been chosen as a model compound because it could be included in NPEs as an active substance [7] and/or as an additive within a pesticide formulation. The relevance of this model relies essentially in the neurotoxicity of PQ, which is known to induce a parkinsonian syndrome both in humans and animals [8]. Indeed, several epidemiological studies associate the professional exposure to paraquat, with the incidence of Parkinson disease among farmers [9]. We plan to use nano-TiO_2 and PQ in combination, to investigate the potential synergistic toxic effect that could occur on the nervous system of chronically exposed rodents.

The experimental design will be built in order to assess the neurotoxicity of chronic inhalation of the compounds of interest both during gestation and adulthood. Mice will be exposed 2h/day, 5 days/week, during gestation or for 8 weeks to relevant doses of nano-TiO_2 and PQ independently and in combination (nano-TiO_2 + PQ). To this end, two mouse lines will be used: a wild type (C57Bl/6) and a transgenic line (TgM-83), the latest being predisposed to the development of a neurodegenerative disease [10]. Neurotoxicity will be assessed using a combination of parameters such as measurements of locomotor ability, histopathology, inflammation, oxidative stress and transcriptomic analyses.

2 Methods

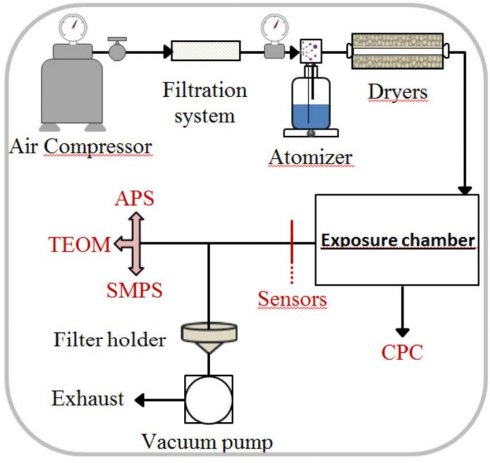


Fig. 1. Scheme of the experimental device

Our exposure device is built by coupling a whole-body chamber with an aerosol nebuliser (Figure 1). The chamber is a rodent cage made out of polysulfone plastic used in animal facility which is sealed and customized to inject and sample aerosols. Moreover, a valve enables to monitor the particles concentrations within the exposure chamber using a condensation particle counter (CPC 3007, TSI). This real-time monitoring ensures the metrological characterization and it guarantees the proper functioning of the device during the animal exposure.

The aerosol is generated from a colloidal suspension of nano-TiO_2 P25 and PQ powders in ultrapure water. Thanks to a collision jet nebulizer (TSI 3076), this system produces droplets using pressurized air (2.5 bars) coming from a silent compressor (42 dB) to avoid animal stress due to noise. Then, the aerosols pass through diffusions dryers which are regenerated before use to obtain a steady hygrometry for two hours. A clean air flow, regulated by mass flow controllers, is chosen to be adequate for both the aerosol homogenization inside the chamber and the animal welfare. A multi-instrumental set-up composed of a real-time monitoring and off-line aerosols samplings is used to characterize mass and number concentrations, particle number size distributions, particle morphology (electron microscopy) and environmental parameters of animals (hygrometry, temperature, pressure). To prevent any leak and ensure the operator safety, the chamber is placed under a slight negative internal pressure thanks to the pumping at the outlet of the chamber. The maximal operating noise and the air renewal are determined to match the best as possible the recommended conditions in animal facilities.

3 Results and discussion

Table 1. Results of the metrological characterization

	PQ	TiO_2	PQ + TiO_2
C_{mass} (mg/m³)	$10{,}1\times10^{-2}$ 3.2%	10.6 8.6%	10.7 4.1%
C_{number} (part/cm³)	2.5×10^{5} 2.4%	2.0×10^{5} 5.1%	2.5×10^{5} 7.8%
d_{median} (nm)	50.0 1.1%	220.3 3.1%	173.3 1.2%

Table 1 summarizes the main results of the characterization measurements conducted in the exposure chamber. Ten assays of two hours were performed for each aerosol (PQ, nano-TiO_2 and PQ + nano-TiO_2). The results are expressed as mass concentration (C_{mass} in mg/m³), number concentration (C_{number} in particles/cm³), and median statistic diameter (d_{median} in nm) with their corresponding relative reproducibility standard deviation calculated according to the ISO 5725-2 standard [5] (in brackets). According to OECD recommendation for aerosols assessment, the concentrations measured by individual samplings should not differ from the mean concentration by more than 20%. The results are therefore in accordance with such recommendations and the test atmosphere can be considered as steady. The chamber temperature (24.6 ± 0.9°C), the hygrometry (19.6 ± 1.2%) and the chamber internal pressure (-0.60 ± 0.04 mbar) were monitored thanks to adequate calibrated sensors. The results of the measurements of the mean mass concentrations are presented in Figure 1.

19th International Congress of Metrology, 07002 (2019) https://doi.org/10.1051/metrology/201907002

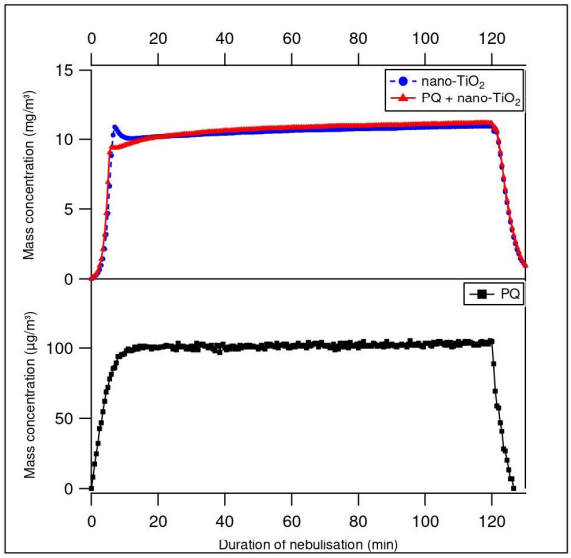


Fig. 2. Real-time total mass concentrations measurements for 120 min of experimentation.

4 Conclusions

NPEs appear as an opportunity for modern agriculture to respond to the worldwide growing demand for food. But the safety of these new products still raises many questions especially concerning the potential health effects of such mixtures. In this context, validated methodologies to study the inhalation toxicity of complex formulations are necessary. Accordingly, we developed and characterized a dedicated device which enables the upcoming NPE neurotoxicity study conducted with a murine model. Finally, it will participate to the production of relevant toxicological data which are required for the health risk assessment related to the chronic exposure to aerosols containing ENMs and pesticides.

This work is carried out as part of a thesis supported by a CIFRE fellowship involving the collaboration of the LNE and the École Normale Supérieure de Lyon (ENS Lyon).

References

1. S. Kumar, M. Nehra, N. Dilbaghi, G. Marrazza, A. A. Hassan, and K.-H. Kim, J. Controlled Release **294**, 131 (2019)

2. M. Kah and T. Hofmann, Environ. Int. **63**, 224 (2014)

3. USDA (2015). https://nifa.usda.gov/press-release/usda-awards-38-million-grants-nanotechnology-research [Accessed 05/06, 2019].

4. OCDE (2018), Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals

5. ISO 5725-2 (1994) Accuracy of measurement methods and results — part 2: basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

6. T. Y. Sun, F. Gottschalk, K. Hungerbühler, and B. Nowack, Environ. Pollut. **185**, 69 (2014)

7. M. F. La Russa, A. Macchia, S. A. Ruffolo, F. De Leo, M. Barberio, P. Barone, G. M. Crisci, and C. Urzì, Int. Biodeterior. Biodegrad. **96**, 87 (2014)

8. S. Bastías-Candia, J. M. Zolezzi, and N. C. Inestrosa, Mol. Neurobiol. **56**, 1044 (2019)

9. C. M. Tanner, F. Kame, G. W. Ross, J. A. Hoppin, S. M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G. S. Bhudhikanok, M. Kasten, A. R. Chade, K. Comyns, M. B. Richards, C. Meng, B. Priestley, H. H. Fernandez, F. Cambi, D. M. Umbach, A. Blair, D. P. Sandler, and J. W. Langston, Environ. Health Perspect. **119**, 866 (2011)

10. B. I. Giasson, J. E. Duda, S. M. Quinn, B. Zhang, J. Q. Trojanowski, and V. M.-Y. Lee, Neuron **34**, 521 (2002)

Development of an aerosol exposure chamber for inhalation toxicology studies: Focus on the nanopesticide case

Quentin HAMDAOUI[1], François GAIE-LEVREL[1], Frédéric FLAMANT[2] and Anna BENCSIK[3]

[1]Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE Paris), France; [2]Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), Ecole Nationale Supérieure (ENS de Lyon), France; [3]Université Lyon 1 , Anses, France

EAC 2019 EUROPEAN AEROSOL CONFERENCE 25-30 Aug 2019 | Gothenburg | Sweden

Introduction

Nanopesticides are new agrochemicals involving the technological inputs of nanotechnology. They are developed in response to the worldwide growing demand for food to limit the environmental footprint of modern agriculture, which is one of the main contamination source of ecosystems. However their fate is still poorly understood as well as their potential effects associated with their inhalation. ***In vivo* models** remain a priority to provide relevant toxicological data for the health risk assessment related to the chronic exposure to hazardous aerosols. Nevertheless, very few models are available to investigate **aerosols inhalation effects** on chronically exposed animals. In order **to explore the neurotoxicity** of a mix of two common substances selected as a model of nanopesticide, a cross-disciplinary strategy was chosen to design a dedicated **inhalation device** for rodents. For this purpose, a whole-body exposure chamber was used with the aim of complying with both recommendations in animal experimentation and OECD guidelines for chemicals testing. This **experimental set-up** and the results of **its metrological characterization** are presented here. This apparatus is now ready to be used to perform the toxicological part of this project.

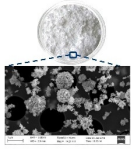
Materials & Methods

Paraquat (PQ)

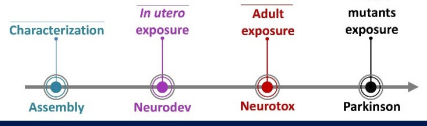
2nd **most used herbicide** in the world, great persistence in soils. The chronic exposure leads to several organ failures including **neurotoxic effects**. It is suspected to trigger the **Parkinson disease** among exposed farmers.

Nano-TiO_2 (P25)

One of the **most used nanoparticle** by numerous industries. According to the actual data on the production and the life cycle in UE, its **environmental contamination** is expected to be one of the most important. Could be used as a nanopesticide : **alone or in combination** with a conventional pesticide.



↑efficiency ↓persistence in soil ↓tonnage

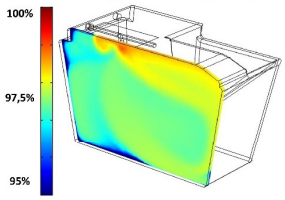


Results

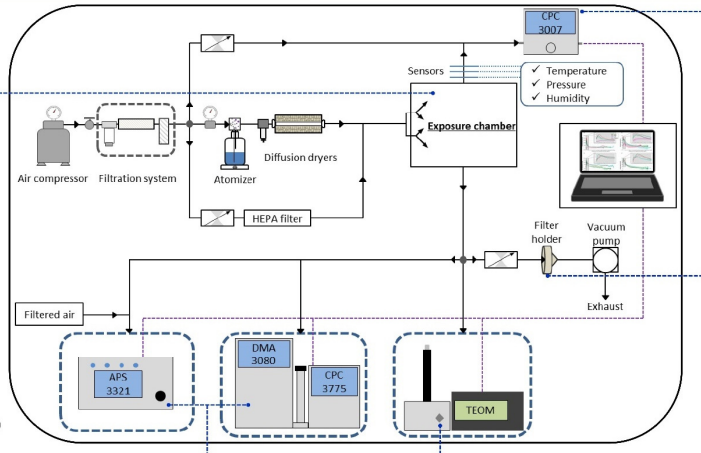
Characterization

At least ten assays of two hours were performed for each aerosol (PQ, nano-TiO_2 and PQ + nano-TiO_2). Results are presented with their corresponding relative reproducibility standard deviation calculated according to the ISO 5725-2 standard. Experimental choices were made to try to comply at best with **animal welfare and ethics.**

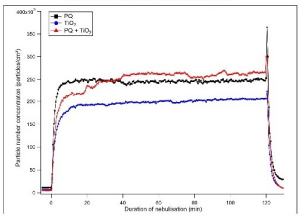
Atmosphere homogeneity



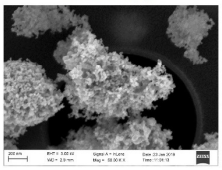
Simulated particle movement (COMSOL software)



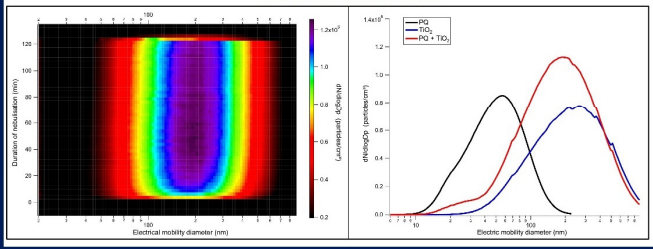
Number concentration



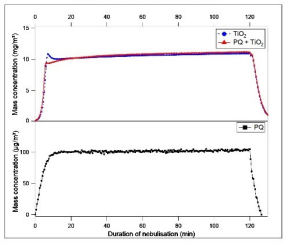
Aerosol Sampling for microscopy



Number size distribution



Mass concentration



Overview

Aerosol / Parameters	PQ	TiO_2	PQ + TiO_2
C_{mass} (mg/m³)	10,1 * 10^{-2}	10.6	10.7
	[3%]	[9%]	[4%]
C_{number} (#/cm³)	2.5 * 10^5	2.0 * 10^5	2.5 * 10^5
	[2%]	[5%]	[8%]
D_{median} (nm)	50	220	173
	[1%]	[3%]	[1%]
Temperature	25 ± 1°C		
Pressure	-60 ± 4 Pa		
Hygrometry	20 ± 1 %		

Conclusions

According to OECD guidelines for aerosols inhalation studies, the concentrations measured by individual sampling should not differ from the mean concentration by more than 20%. The results are in accordance with such recommendations and the test atmosphere is considered steady. Built by **coupling a classical animal cage with a jet collision nebulizer**, this *in vivo* inhalation device is designed to **deliver a stable and controlled atmosphere** in the exposure chamber. The whole body exposure appears to be the most realistic and accurate way to expose animal chronically by allowing a natural behavior during the exposure phases. This apparatus is versatile and it could be used **to expose different animal models to a large panel of substances**. It complies with requirements for animal welfare and then it minimizes the bias induced by detrimental animal stress. Thus, the optimization of the reproducibility in addition to the monitoring of the inhaled dose contribute to enhance the standardization of toxicology studies which are usually difficult to compare because of their heterogeneity. **The first step of this study responds to the need to better characterize the models of study in toxicology and it proposes a simple model to reproduce realistic exposure scenarios.**

Acknowledgments: This **thesis work** is supported by a CIFRE fellowship between the **LNE** and the **ENS de Lyon**

Contact: quentin.hamdaoui@lne.fr

Mes contributions en tant que doctorant

J'ai réalisé personnellement les travaux présentés au cours de mon travail de thèse, à l'exception de certains points que je me dois de souligner :

La simulation numérique des concentrations particulaires (CFD) a été réalisée par Simon Delcour (département Comportement au feu et sécurité incendie du LNE).

Les analyses ICP-MS des cerveaux et des poumons, ont été effectuées par le département « Biomédical et Chimie Inorganique » du LNE, sous la responsabilité de Paola Fisicaro et Caroline Oster.

La préparation des coupes histologiques a été réalisée par le CRCL, sous la supervision de Nicolas Gadot responsable de la Plateforme Anatomopathologie Recherche (Département de recherche translationnelle et d'innovation).

La préparation des banques génomiques du RNA-seq a été réalisée par Romain Guyot et Yanis Zekri de l'équipe Flamant, au sein de la plateforme de séquençage haut-débit de l'IGFL.

L'élevage de la lignée mutante TgM83 a été réalisé par la plateforme du Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES), afin d'obtenir suffisamment de femelles du même âge au bon moment, sous la responsabilité de Nadine Aguilera.

Bibliographie

Abou-Sleiman, Patrick M., Miratul M. K. Muqit, et Nicholas W. Wood. 2006. « Expanding Insights of Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease ». Nature Reviews Neuroscience 7(3): 207-19.

Adamcakova-Dodd, Andrea et al. 2015. « Effects of prenatal inhalation exposure to copper nanoparticles on murine dams and offspring ». Particle and Fibre Toxicology 12(1): 30.

Afeseh Ngwa, Hilary et al. 2011. « Manganese Nanoparticle Activates Mitochondrial Dependent Apoptotic Signaling and Autophagy in Dopaminergic Neuronal Cells ». Toxicology and Applied Pharmacology 256(3): 227-40.

Agathokleous, Evgenios, ZhaoZhong Feng, Ivo Iavicoli, et Edward J. Calabrese. 2020. « Nano-Pesticides: A Great Challenge for Biodiversity? The Need for a Broader Perspective ». Nano Today 30: 100808.

Ahmed, Amal, et Mohammed Ali. 2018. « The Influence of Titanium Dioxide Nanoparticles Incorporation into Soft Denture Lining Material on Candida Albicans Adherence and Some Mechanical and Physical Properties ». Journal of Pure and Applied Microbiology 12(2): 783-91.

Ait-Bali, Yassine, Saadia Ba-M'hamed, et Mohammed Bennis. 2016. « Prenatal Paraquat exposure induces neurobehavioral and cognitive changes in mice offspring ». Environmental Toxicology and Pharmacology 48: 53-62.

Al Heidary, M., J. P. Douzals, C. Sinfort, et A. Vallet. 2014. « Influence of spray characteristics on potential spray drift of field crop sprayers: A literature review ». Crop Protection 63: 120-30.

Amézaga-Madrid, P. et al. 2003. « TEM Evidence of Ultrastructural Alteration on Pseudomonas Aeruginosa by Photocatalytic TiO2 Thin Films ». Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology 70(1): 45-50.

Anders, Simon, Paul Theodor Pyl, et Wolfgang Huber. 2015. « HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data ». Bioinformatics 31(2): 166-69.

Anderson, Timothy et al. 2020. « Paraquat Inhalation, a Translationally Relevant Route of Exposure: Disposition to the Brain and Male-Specific Olfactory Impairment in Mice ». Toxicological Sciences (kfaa183). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa183 (4 janvier 2021).

Andrew Clayton, C. et al. 2003. « Distributions, Associations, and Partial Aggregate Exposure of Pesticides and Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Minnesota Children's Pesticide Exposure Study (MNCPES) ». Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology 13(2): 100-111.

Ankley, Gerald T. et al. 2010. « Adverse Outcome Pathways: A Conceptual Framework to Support Ecotoxicology Research and Risk Assessment ». Environmental Toxicology and Chemistry 29(3): 730-41.

ANSES (2010) - « Exposition de la population générale aux pesticides | Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ». https://www.anses.fr/fr/content/exposition-de-la-population-g%C3%A9n%C3%A9rale-aux-pesticides (21 février 2021).

ANSES (2020) RAPPORT AST révisé de l'Anses relatif aux premières interprétations des résultats de la Campagne Nationale Exploratoire des Pesticides (CNEP) dans l'air ambiant | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ». (22 février 2021).

ANSES (2020): Avis de l'ANSES Rapport d'expertise collective, Novembre 2020 ». https://www.actu-environnement.com/media/pdf/news-36606-Avis-anses-nano-novembre-2020.pdf (23 février 2021).

Aprea, C. et al. 2004. « Evaluation of Skin and Respiratory Doses and Urinary Excretion of Alkylphosphates in Workers Exposed to Dimethoate During Treatment of Olive Trees ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology 48(1): 127-34.

Asgharian, B. 2004. « A Model of Deposition of Hygroscopic Particles in the Human Lung ». Aerosol Science and Technology 38(9): 938-47.

Averett, Stewart Benson, et Devron R. Averett. 2017. « Titanium dioxide photocatalytic compositions and uses thereof ». http://www.freepatentsonline.com/9833003.html (3 mai 2019).

Badli, Nur Afiqah, Rusmidah Ali, Wan Azelee Wan Abu Bakar, et Leny Yuliati. 2017. « Role of Heterojunction ZrTiO4/ZrTi2O6/TiO2 Photocatalyst towards the Degradation of Paraquat Dichloride and Optimization Study by Box–Behnken Design ». Arabian Journal of Chemistry 10(7): 935-43.

Baisch, Brittany L. et al. 2014. « Equivalent Titanium Dioxide Nanoparticle Deposition by Intratracheal Instillation and Whole Body Inhalation: The Effect of Dose Rate on Acute Respiratory Tract Inflammation ». Particle and Fibre Toxicology 11: 5.

Bakand, S., et A. Hayes. 2016. « Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles ». International Journal of Molecular Sciences 17(6).

Balbi, T. et al. 2014. « Co-exposure to n-TiO2 and Cd2+ results in interactive effects on biomarker responses but not in increased toxicity in the marine bivalve M. galloprovincialis ». Science of the Total Environment 493: 355-64.

Baldi, Isabelle et al. 2012. « Levels and Determinants of Pesticide Exposure in Operators Involved in Treatment of Vineyards: Results of the PESTEXPO Study ». Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology 22(6): 593-600.

Baldi, Isabelle et al. 2014. « Levels and Determinants of Pesticide Exposure in Re-Entry Workers in Vineyards: Results of the PESTEXPO Study ». Environmental Research 132: 360-69.

Barouki, Robert et al. 2012. « Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health ». Environmental Health 11(1): 42.

Barouki, Robert. 2013. « Environnement et santé : les leçons des pesticides ». médecine/sciences 29(3): 235-36.

Bastías-Candia, S., J.M. Zolezzi, et N.C. Inestrosa. 2019. « Revisiting the Paraquat-Induced Sporadic Parkinson's Disease-Like Model ». Molecular Neurobiology 56(2): 1044-55.

Bau and Witschger. 2016 « Dispositif de contrôle des Compteurs (DCC) : développement, qualification et mise en place d'une procédure opérationnelle ». INRS https://www.inrs.fr/inrs/recherche/etudes-publications-communications/doc/publication.html?refINRS=EL2014-009/P2016-040/NS343 (28 février 2021).

Bedos, Carole et al. 2002. « Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: Overview ». http://dx.doi.org/10.1051/agro:2001003 22.

Bellou, Vanesa et al. 2016. « Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: An Umbrella Review of Meta-Analyses ». Parkinsonism & Related Disorders 23: 1-9.

Bemer, Denis et al. 2011. « CHARGE ÉLECTRIQUE DES AÉROSOLS MESURE ET INFLUENCE DE CE PARAMÈTRE ». Hygiène et sécurité du travail (Paris) (225).

Bencsik, Anna et al. 2014. « Early and Persistent Expression of Phosphorylated α-Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α-Synuclein Transgenic Mice ». Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 73(12): 1144-51.

Bencsik, Anna, et Philippe Lestaevel. 2021. « The Challenges of 21st Century Neurotoxicology: The Case of Neurotoxicology Applied to Nanomaterials ». Frontiers in Toxicology 3. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ftox.2021.629256/full (24 mars 2021).

Bencsik, Anna, Philippe Lestaevel, et Irina Guseva Canu. 2018. « Nano- and Neurotoxicology: An Emerging Discipline ». Progress in Neurobiology 160: 45-63.

Bermudez, E. et al. 2004. « Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles ». Toxicological Sciences 77(2): 347-57.

Bernal-Meléndez, Estefanía. 2019. « Toxicité neuro-développementale d'une exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique : effets à court et à long terme de l'inhalation répétée de particules de fumées de diesel chez le lapin ». Phd thesis. Université de Lorraine. https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02516747 (24 février 2021).

Berry, C., C. La Vecchia, et P. Nicotera. 2010. « Paraquat and Parkinson's Disease ». Cell Death and Differentiation 17(7): 1115-25.

Bettini, Sarah et al. 2017. « Food-grade TiO2 impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon ». Scientific Reports 7. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5247795/ (22 février 2021).

Bharath, Srinivas et al. 2002. « Glutathione, Iron and Parkinson's Disease ». Biochemical Pharmacology 64(5): 1037-48.

Bialkowska, Agnieszka B., Amr M. Ghaleb, Mandayam O. Nandan, et Vincent W. Yang. 2016. « Improved Swiss-rolling Technique for Intestinal Tissue Preparation for Immunohistochemical and Immunofluorescent Analyses ». JoVE (Journal of Visualized Experiments) (113): e54161.

Bierkandt, Frank S. et al. 2018. « The impact of nanomaterial characteristics on inhalation toxicity ». Toxicology Research 7(3): 321-46.

Bindea, Gabriela et al. 2009. « ClueGO: A Cytoscape Plug-in to Decipher Functionally Grouped Gene Ontology and Pathway Annotation Networks ». Bioinformatics (Oxford, England) 25(8): 1091-93.

Block, Michelle L., et Lilian Calderón-Garcidueñas. 2009. « Air Pollution: Mechanisms of Neuroinflammation and CNS Disease ». Trends in Neurosciences 32(9): 506-16.

Bolton Jessica L. et al. 2013. « Maternal Stress and Effects of Prenatal Air Pollution on Offspring Mental Health Outcomes in Mice ». Environmental Health Perspectives 121(9): 1075-82.

Bondarenko, O. et al. 2013. « Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review ». Archives of Toxicology 87(7): 1181-1200.

Bongaerts, Eva et al. 2020. « Translocation of (ultra)fine particles and nanoparticles across the placenta; a systematic review on the evidence of in vitro, ex vivo, and in vivo studies ». Particle and Fibre Toxicology 17(1): 56.

Bonner, Matthew R., et Michael C. R. Alavanja. 2017. « Pesticides, Human Health, and Food Security ». Food and Energy Security 6(3): 89-93.

Borm, Paul JA et al. 2006. « The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC ». Particle and Fibre Toxicology 3(1): 11.

Bos, Peter M. J. et al. 2019. « Pulmonary Toxicity in Rats Following Inhalation Exposure to Poorly Soluble Particles: The Issue of Impaired Clearance and the Relevance for Human Health Hazard and Risk Assessment ». Regulatory Toxicology and Pharmacology 109: 104498.

Botta, Dianne et al. 2004. « Glutamate-Cysteine Ligase Attenuates TNF-Induced Mitochondrial Injury and Apoptosis ». Free Radical Biology and Medicine 37(5): 632-42.

Boukhzar, Loubna et al. 2016. « Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease ». Antioxidants & Redox Signaling 24(11): 557-74.

Boxi, Siddhartha Sankar, Khushi Mukherjee, et Santanu Paria. 2016. « Ag Doped Hollow TiO2 Nanoparticles as an Effective Green Fungicide against Fusarium Solani and Venturia Inaequalis Phytopathogens ». Nanotechnology 27(8): 085103.

Boyes, William K., et Christoph van Thriel. 2020. « Neurotoxicology of Nanomaterials ». Chemical Research in Toxicology 33(5): 1121-44.

Braak, Heiko et al. 2002. « Staging of the Intracerebral Inclusion Body Pathology Associated with Idiopathic Parkinson's Disease (Preclinical and Clinical Stages) ». Journal of Neurology 249(3): iii1-5.

Braak, Heiko et al. 2003. « Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease ». Neurobiology of Aging 24(2): 197-211.

Braak, Heiko et al. 2004. « Stages in the Development of Parkinson's Disease-Related Pathology ». Cell and Tissue Research 318(1): 121-34.

Breckenridge, Charles B. et al. 2013. « Pharmacokinetic, Neurochemical, Stereological and Neuropathological Studies on the Potential Effects of Paraquat in the Substantia Nigra Pars Compacta and Striatum of Male C57BL/6J Mice ». NeuroToxicology 37: 1-14.

Brouwer, Maartje et al. 2017. « Environmental Exposure to Pesticides and the Risk of Parkinson's Disease in the Netherlands ». Environment International 107: 100-110.

Brown, Angus M. 2005. « A New Software for Carrying out One-Way ANOVA Post Hoc Tests ». Computer Methods and Programs in Biomedicine 79(1): 89-95.

Brun, Emilie et al. 2014. « Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia ». Particle and Fibre Toxicology 11(1): 13.

Brun, Emilie, Marie Carrière, et Aloïse Mabondzo. 2012. « In vitro evidence of dysregulation of blood–brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO2 nanoparticles ». Biomaterials 33(3): 886-96.

Buzea, Cristina, et Ivan Pacheco. 2019. « Toxicity of Nanoparticles ». In Nanotechnology in Eco-Efficient Construction, Elsevier, 705-54. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081026410000281 (22 février 2021).

Buzea, Cristina, Ivan I. Pacheco, et Kevin Robbie. 2007. « Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity ». Biointerphases 2(4): MR17-71.

Cai, Jie et al. 2019. « Translocation of Transition Metal Oxide Nanoparticles to Breast Milk and Offspring: The Necessity of Bridging Mother-Offspring-Integration Toxicological Assessments ». Environment International 133: 105153.

Calderón-Garcidueñas, Lilian et al. 2003. « DNA Damage in Nasal and Brain Tissues of Canines Exposed to Air Pollutants Is Associated with Evidence of Chronic Brain Inflammation and Neurodegeneration ». Toxicologic Pathology 31(5): 524-38.

Calderón-Garcidueñas. 2008. « Long-Term Air Pollution Exposure Is Associated with Neuroinflammation, an Altered Innate Immune Response, Disruption of the Blood-Brain Barrier, Ultrafine Particulate Deposition, and Accumulation of Amyloid β-42 and α-Synuclein in Children and Young Adults ». Toxicologic Pathology 36(2): 289-310.

Calderón-Garcidueñas. 2011. « Exposure to Severe Urban Air Pollution Influences Cognitive Outcomes, Brain Volume and Systemic Inflammation in Clinically Healthy Children ». Brain and Cognition 77(3): 345-55.

Calderón-Garcidueñas. 2013. « Early Alzheimer's and Parkinson's Disease Pathology in Urban Children: Friend versus Foe Responses—It Is Time to Face the Evidence ». BioMed Research International 2013: e161687.

Campbell, Jerry L. et al. 2021. « Integration of Paraquat Pharmacokinetic Data across Species Using PBPK Modelling ». Toxicology and Applied Pharmacology: 115462.

Cantavenera, Maria Jlenia et al. 2007. « Photocatalytic Degradation of Paraquat and Genotoxicity of Its Intermediate Products ». Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 185(2): 277-82.

Cao, Lidong et al. 2016. « Quaternized Chitosan-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles as Nanocarriers for Controlled Pesticide Release ». Nanomaterials 6(7): 126.

Carboni, Eleonora, et Paul Lingor. 2015. « Insights on the Interaction of Alpha-Synuclein and Metals in the Pathophysiology of Parkinson's Disease ». Metallomics: Integrated Biometal Science 7(3): 395-404.

Carrière, Audrey et al. 2006. « Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie ». médecine/sciences 22(1): 47-53.

Casellas, J. 2011. « Inbred Mouse Strains and Genetic Stability: A Review ». Animal 5(1): 1-7.

Ceña, V., et P. Játiva. 2018. « Nanoparticle crossing of blood-brain barrier: A road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases ». Nanomedicine 13(13): 1513-16.

« Chapitre IV : La protection des animaux. (Articles L214-1 à L214-23) - Légifrance ». https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006071367/LEGISCTA000006152208/#LEGISCTA000006152208 (22 février 2021).

Chavatte-Palmer, Pascale, et Anne Tarrade. 2016. « Placentation in Different Mammalian Species ». Annales d'Endocrinologie 77(2): 67-74.

Chester, G., et R. J. Ward. 1984. « Occupational Exposure and Drift Hazard during Aerial Application of Paraquat to Cotton ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology 13(5): 551-63.

Chester, G., et B. H. Woollen. 1982. « Studies of the Occupational Exposure of Malaysian Plantation Workers to Paraquat. » Occupational and Environmental Medicine 39(1): 23-33.

Cho, Wan-Seob et al. 2013. « Comparative Absorption, Distribution, and Excretion of Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles after Repeated Oral Administration ». Particle and Fibre Toxicology 10: 9.

Chowdhury, Pankaj, A. Elkamel, et Ajay Ray. 2014. Heavy Metals In Water : Presence, Removal and Safety; CHAPTER 2: Photocatalytic Processes for the Removal of Toxic Metal Ions.

Chuong Nguyen, Minh Vu et al. 2015. « Les NADPH oxydases, Nox : Une nouvelle famille d'isoenzymes ». M/S. Médecine sciences [ISSN papier : 0767-0974 ; ISSN numérique : 1958-5381], 2015, Vol. 31, N° 1; p. 43-52. https://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/8547 (22 février 2021).

Ciesielski-Treska, J. et al. 1998. « Chromogranin A Induces a Neurotoxic Phenotype in Brain Microglial Cells ». The Journal of Biological Chemistry 273(23): 14339-46.

Cledón, M., S.K. Brar, et T.C. Zhang. 2015. « Nano-ecotoxicology of natural and engineered nanomaterials for microorganisms ». In Nanomaterials in the Environment, , 439-68.

Cline, Melissa S. et al. 2007. « Integration of Biological Networks and Gene Expression Data Using Cytoscape ». Nature Protocols 2(10): 2366-82.

Colle, Dirleise et al. 2020a. « Early Postnatal Exposure to Paraquat and Maneb in Mice Increases Nigrostriatal Dopaminergic Susceptibility to a Re-Challenge with the Same Pesticides at Adulthood: Implications for Parkinson's Disease ». Neurotoxicity Research 37(1): 210-26.

Cornelis, Geert et al. 2014. « Fate and Bioavailability of Engineered Nanoparticles in Soils: A Review ». Critical Reviews in Environmental Science and Technology 44(24): 2720-64.

Cory-Slechta Deborah A., Thiruchelvam Mona, Barlow Brian K., et Richfield Eric K. 2005. « Developmental Pesticide Models of the Parkinson Disease Phenotype ». Environmental Health Perspectives 113(9): 1263-70.

Coscollà, Clara et al. 2010. « Occurrence of Currently Used Pesticides in Ambient Air of Centre Region (France) ». Atmospheric Environment 44(32): 3915-25.

Coscollà, Clara et al. 2013. « Particle size distributions of currently used pesticides in a rural atmosphere of France ». Atmospheric Environment 81: 32-38.

Coscollà, Clara et al. 2014. « Particle size distributions of currently used pesticides in ambient air of an agricultural Mediterranean area ». Atmospheric Environment 95: 29-35.

Costa, Lucio G., Corrado L. Galli, et Sheldon D. Murphy. 2013. Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives. Springer Science & Business Media.

Costello, Sadie et al. 2009. « Parkinson's Disease and Residential Exposure to Maneb and Paraquat from Agricultural Applications in the Central Valley of California ». American Journal of Epidemiology 169(8): 919-26.

Creutzenberg, Otto et al. 2012. « Change in agglomeration status and toxicokinetic fate of various nanoparticles in vivo following lung exposure in rats ». Inhalation Toxicology 24(12): 821-30.

Crooks Mark. 2014 « Fast Particle Size Distribution Measurements with SMPS utilizing a Novel Classifier ». TSI https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:-vJcqsD07rAJ:https://a.storyblok.com/f/77802/x/3f545a7c36/cpm_crooks_2014_fast-particle-size-distribution-measurements-with-smps-utilizing-a-novel-classifier.pdf+&cd=1&hl=fr&ct=clnk&gl=fr&client=opera (21 avril 2021).

Cross, Carroll E. et al. 1987. « Oxygen Radicals and Human Disease ». Annals of Internal Medicine 107(4): 526-45.

Crowe, Tyler P., M. Heather West Greenlee, Anumantha G. Kanthasamy, et Walter H. Hsu. 2018. « Mechanism of Intranasal Drug Delivery Directly to the Brain ». Life Sciences 195: 44-52.

Cui, Yonghua et al. 2014. « Prenatal Exposure to Nanoparticulate Titanium Dioxide Enhances Depressive-like Behaviors in Adult Rats ». Chemosphere 96: 99-104.

Cunha, S. et al. 2017. « Intranasal Lipid Nanoparticles for the Treatment of Neurodegenerative Diseases ». Current Pharmaceutical Design.

Curl Cynthia L et al. 2002. « Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. » Environmental Health Perspectives 110(12): A787-92.

D'Agostino, Ralph B. 2017. Goodness-of-Fit-Techniques. Routledge.

Dalai, Swayamprava et al. 2014. « Toxic Effect of Cr(VI) in Presence of n-TiO2 and n-Al2O3 Particles towards Freshwater Microalgae ». Aquatic Toxicology 146: 28-37.

Daniel, J. W., et J. C. Gage. 1966a. « Absorption and Excretion of Diquat and Paraquat in Rats ». British Journal of Industrial Medicine 23(2): 133-36.

Darquenne, Chantal. 2012. « Aerosol Deposition in Health and Disease ». Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery 25(3): 140-47.

Dastjerdi, Roya, et Majid Montazer. 2010. « A Review on the Application of Inorganic Nano-Structured Materials in the Modification of Textiles: Focus on Anti-Microbial Properties ». Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 79(1): 5-18.

De, Arnab, Rituparna Bose, Ajeet Kumar, et Subho Mozumdar. 2014. « Management of Insect Pests Using Nanotechnology: As Modern Approaches ». Springer Briefs in Molecular Science,. New Delhi: Springer India, 29-33. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1689-6_8 (22 février 2021).

De Filpo, Giovanni, Anna Maria Palermo, Francesca Rachiele, et Fiore Pasquale Nicoletta. 2013. « Preventing Fungal Growth in Wood by Titanium Dioxide Nanoparticles ». International Biodeterioration & Biodegradation 85: 217-22.

Della Torre, Camilla et al. 2015. « Titanium Dioxide Nanoparticles Modulate the Toxicological Response to Cadmium in the Gills of Mytilus Galloprovincialis ». Journal of Hazardous Materials 297: 92-100.

Deportes, Isabelle, Fabienne Muller, Thomas Eglin, et Agnès Heyberger-Paroisse. 2018. matières fertilisantes organiques : gestion et épandage guide des bonnes pratiques.

Derveaux, Stefaan, Jo Vandesompele, et Jan Hellemans. 2010. « How to Do Successful Gene Expression Analysis Using Real-Time PCR ». Methods (San Diego, Calif.) 50(4): 227-30.

Dinis-Oliveira, R. J. et al. 2008. « Paraquat Poisonings: Mechanisms of Lung Toxicity, Clinical Features, and Treatment ». Critical Reviews in Toxicology 38(1): 13-71.

Disdier, Clémence et al. 2017. « Brain Inflammation, Blood Brain Barrier Dysfunction and Neuronal Synaptophysin Decrease after Inhalation Exposure to Titanium Dioxide Nano-Aerosol in Aging Rats ». Scientific Reports 7(1): 1-13.

Donaldson, K. et al. 2008. « Concordance Between In Vitro and In Vivo Dosimetry in the Proinflammatory Effects of Low-Toxicity, Low-Solubility Particles: The Key Role of the Proximal Alveolar Region ». Inhalation Toxicology 20(1): 53-62.

Dorato, M. A., et R. K. Wolff. 1991. « Inhalation Exposure Technology, Dosimetry, and Regulatory Issues ». Toxicologic Pathology 19(4 Pt 1): 373-83.

Driscoll, Kevin E. et al. 2000. « Intratracheal Instillation as an Exposure Technique for the Evaluation of Respiratory Tract Toxicity: Uses and Limitations ». Toxicological Sciences 55(1): 24-35.

Du, J. et al. 2019. « The ecotoxicology of titanium dioxide nanoparticles, an important engineering nanomaterial ». Toxicological and Environmental Chemistry 101(3-6): 165-89.

Duerden, L. 1994c. « Duerden L (1994c) Paraquat dichloride technical concentrate: acute dermal toxicity to the rat. Study No. CR3130. ZCTL, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, UK. Report No. CTL/P/4412, 30 September 1994. Unpublished. »

Ebrahimzadeh Bideskan, Alireza et al. 2017. « Maternal Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles during Pregnancy and Lactation Alters Offspring Hippocampal MRNA BAX and Bcl-2 Levels, Induces Apoptosis and Decreases Neurogenesis ». Experimental and Toxicologic Pathology 69(6): 329-37.

Edwards, Stephen W. et al. 2016. « Adverse Outcome Pathways—Organizing Toxicological Information to Improve Decision Making ». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 356(1): 170-81.

Egerton, R. F. 2011. Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope. Springer Science & Business Media.

van Eijl, S. et al. 2006. « Stress and Hypothermia in Mice in a Nose-Only Cigarette Smoke Exposure System ». Inhalation Toxicology 18(11): 911-18.

Elder Alison et al. 2006. « Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System ». Environmental Health Perspectives 114(8): 1172-78.

Emsley, John. 2011. Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements. OUP Oxford.

Endres, Matthias, Lorenz Hirt, et Michael A. Moskowitz. 2001. « Apoptosis and Cerebral Ischemia ». In Advances in Cell Aging and Gerontology, Programmed Cell Death Volume II, Elsevier, 137-67. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1566312401060060 (3 mai 2021).

Eng, Lawrence F., et Roopa S. Ghirnikar. 1994. « GFAP and Astrogliosis ». Brain Pathology 4(3): 229-37.

Engler-Chiurazzi, E.B. et al. 2016. « Impacts of prenatal nanomaterial exposure on male adult Sprague-Dawley rat behavior and cognition ». Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues 79(11): 447-52.

Eskenazi B et Castorina R. 1999. « Association of prenatal maternal or postnatal child environmental tobacco smoke exposure and neurodevelopmental and behavioral problems in children. » Environmental Health Perspectives 107(12): 991-1000.

« European Union Report on Pesticide Residues in Food ». 2020. European Food Safety Authority. https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6057 (21 février 2021).

Everaert, Celine et al. 2017. « Benchmarking of RNA-Sequencing Analysis Workflows Using Whole-Transcriptome RT-QPCR Expression Data ». Scientific Reports 7(1): 1559.

Fan, Wenhong et al. 2011. « Nano-TiO2 Enhances the Toxicity of Copper in Natural Water to Daphnia Magna ». Environmental Pollution 159(3): 729-34.

Fang, Liping et al. 2011. « Toxicity and Uptake of TRI- and Dibutyltin in Daphnia Magna in the Absence and Presence of Nano-Charcoal ». Environmental Toxicology and Chemistry 30(11): 2553-61.

Fang, Qi et al. 2015. « Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Bioavailability, Metabolism, and Toxicity of Pentachlorophenol in Zebrafish Larvae ». Journal of Hazardous Materials 283: 897-904.

Feizi, Hassan, Parviz Rezvani Moghaddam, Nasser Shahtahmassebi, et Amir Fotovat. 2012. « Impact of Bulk and Nanosized Titanium Dioxide (TiO2) on Wheat Seed Germination and Seedling Growth ». Biological Trace Element Research 146(1): 101-6.

Fenske, R. A. 1993. « Dermal Exposure Assessment Techniques ». The Annals of Occupational Hygiene 37(6): 687-706.

Fernagut, P. O. et al. 2007. « Behavioral and Histopathological Consequences of Paraquat Intoxication in Mice: Effects of α-Synuclein over-Expression ». Synapse 61(12): 991-1001.

Finkel, Toren. 2011. « Signal transduction by reactive oxygen species ». Journal of Cell Biology 194(1): 7-15.

Fletcher, K. 1967. « Fletcher K (1967) Toxicity tests on Gramoxone (LTS) for registration in the USSR. ICI Ltd, Industrial Hygiene Research Laboratories, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, UK. Report No. IHR/213, April 1967. Unpublished. »

Florêncio, Maria et al. 2004. « Photodegradation of Diquat and Paraquat in aqueous solutions by titanium dioxide: Evolution of degradation reactions and characterisation of intermediates ». Chemosphere 55: 345-55.

Foley, Paul, et P Riederer. 2000. Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease.

Fortenberry, Gamola Z. et al. 2016. « Magnitude and Characteristics of Acute Paraquat- and Diquat-Related Illnesses in the US: 1998-2013 ». Environmental Research 146: 191-99.

Fortune, Owolade Oluwaferanmi, et Ogunleti David Ogundeji. 2008. « Effects of Titanium Dioxide on the Diseases, Development and Yield of Edible Cowpea ». Journal of Plant Protection Research 48(3): 329-35.

Franco, Rodrigo et al. 2010. « Molecular Mechanisms of Pesticide-Induced Neurotoxicity: Relevance to Parkinson's Disease ». Chemico-Biological Interactions 188(2): 289-300.

Fréry, Nadine et al. 2009. « Etude d'imprégnation par les dioxines des populations résidant à proximité d'usines d'incinération d'ordures ménagères ». Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire: 64.

Friedlander, Sheldon K., Kenya Ogawa, et Marc Ullmann. 2000. « Elastic behavior of nanoparticle chain aggregates: A hypothesis for polymer–filler behavior ». Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 38(20): 2658-65.

Fröhlich, Eleonore, et Sharareh Salar-Behzadi. 2014. « Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, Ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies ». International Journal of Molecular Sciences 15(3): 4795-4822.

Fukumoto, Keita et al. 2018. « Identification of Genes Regulating GABAergic Interneuron Maturation ». Neuroscience Research 134: 18-29.

Gaffet, Eric et al. 2018. Bilan des connaissances relatives aux effets des nanoparticules de TiO2 sur la santé humaine ; caractérisation de l'exposition des populations et mesures de gestion [Rapport]. Haut Conseil de la Santé Publique. Research Report. https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01822476 (22 février 2021).

Gage, J. C. 1968. « Toxicity of Paraquat and Diquat Aerosols Generated by a Size-selective Cyclone: Effect of Particle Size Distribution ». British Journal of Industrial Medicine 25(4): 304-14

Gawarammana, Indika B., et Nicholas A. Buckley. 2011. « Medical Management of Paraquat Ingestion ». British Journal of Clinical Pharmacology 72(5): 745-57.

Geerts, Cornelia J. et al. 2015. « Tomosyn-2 Is Required for Normal Motor Performance in Mice and Sustains Neurotransmission at Motor Endplates ». Brain Structure & Function 220(4): 1971-82.

Gene Ontology Consortium. 2015. « Gene Ontology Consortium: Going Forward ». Nucleic Acids Research 43(Database issue): D1049-1056.

Geraets, Liesbeth et al. 2014. « Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats ». Particle and Fibre Toxicology 11(1): 30.

Gerlach, M., K. L. Double, M. B. H. Youdim, et P. Riederer. 2006. « Potential Sources of Increased Iron in the Substantia Nigra of Parkinsonian Patients ». In Parkinson's Disease and Related Disorders, Journal of Neural Transmission. Supplementa, éd. P. Riederer, H. Reichmann, M. B. H. Youdim, et M. Gerlach. Vienna: Springer, 133-42.

Giasson, Benoit I. et al. 2002. « Neuronal α-Synucleinopathy with Severe Movement Disorder in Mice Expressing A53T Human α-Synuclein ». Neuron 34(4): 521-33.

Gilbertson, L.M. et al. 2020. « Guiding the design space for nanotechnology to advance sustainable crop production ». Nature Nanotechnology 15(9): 801-10.

Gillespie, Patricia A. et al. 2010. « Pulmonary Response after Exposure to Inhaled Nickel Hydroxide Nanoparticles: Short and Long-Term Studies in Mice ». Nanotoxicology 4(1): 106-19.

Ginsberg, Matthew R. et al. 2012. « Brain Transcriptional and Epigenetic Associations with Autism ». PLOS ONE 7(9): e44736.

Gogos, Alexander, Katja Knauer, et Thomas D. Bucheli. 2012. « Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization: Current State, Foreseen Applications, and Research Priorities ». Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(39): 9781-92.

Gollamudi, Seema et al. 2012. « Concordant Signaling Pathways Produced by Pesticide Exposure in Mice Correspond to Pathways Identified in Human Parkinson's Disease ». PLoS ONE 7(5). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341364/ (18 décembre 2020).

Gomez, Virginia, Silvia Irusta, Francisco Balas, et Jesus Santamaria. 2013. « Generation of TiO2 Aerosols from Liquid Suspensions: Influence of Colloid Characteristics ». Aerosol Science and Technology 47(12): 1383-92.

Gramowski Alexandra et al. 2010. « Nanoparticles Induce Changes of the Electrical Activity of Neuronal Networks on Microelectrode Array Neurochips ». Environmental Health Perspectives 118(10): 1363-69.

Grassian, Vicki H. et al. 2007. « Inhalation Exposure Study of Titanium Dioxide Nanoparticles with a Primary Particle Size of 2 to 5 nm ». Environmental Health Perspectives 115(3): 397-402.

Griffis, L. C. et al. 1979. « Pulmonary Deposition of a /Sup 99m/Tc-Labeled Aerosol in a Whole-Body Exposure ». http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:12573458 (18 septembre 2020).

Grillo, R., A. H. Rosa, et L. F. Fraceto. 2014. « Poly(ε-Caprolactone) Nanocapsules Carrying the Herbicide Atrazine: Effect of Chitosan-Coating Agent on Physico-Chemical Stability and Herbicide Release Profile ». International Journal of Environmental Science and Technology 11(6): 1691-1700.

Grillo, Renato et al. 2021. « Ecotoxicological and Regulatory Aspects of Environmental Sustainability of Nanopesticides ». Journal of Hazardous Materials 404: 124148.

Grissa, Intissar et al. 2016. « The Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on Neuroinflammation Response in Rat Brain ». Environmental Science and Pollution Research 23(20): 20205-13.

Guan, Hua-Nan, De-Fu Chi, Jia Yu, et Si-Yu Zhang. 2011. « Novel Photodegradable Insecticide W/TiO2/Avermectin Nanocomposites Obtained by Polyelectrolytes Assembly ». Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 83(1): 148-54.

Guillard, A. et al. 2020. « Basal Ti level in the human placenta and meconium and evidence of a materno-foetal transfer of food-grade TiO2 nanoparticles in an ex vivo placental perfusion model ». Particle and Fibre Toxicology 17(1): 51.

Guiral, Clarisse et al. 2016. les emissions de produits phytopharmaceutiques dans l'air - Facteurs d'émission, outils d'estimation des émissions, évaluations environnementales et perspectives de recherche : Synthèse.

Gumusoglu, Serena B., et Hanna E. Stevens. 2019. « Maternal Inflammation and Neurodevelopmental Programming: A Review of Preclinical Outcomes and Implications for Translational Psychiatry ». Biological Psychiatry 85(2): 107-21.

Gunnarsson, Lars-Gunnar, et Lennart Bodin. 2017. « Parkinson's disease and occupational exposures: a systematic literature review and meta-analyses ». Scandinavian Journal of Work, Environment & Health 43(3): 197-209.

Haghighi, F. et al. 2012. « The Evaluation of Candida Albicans Biofilms Formation on Silicone Catheter, PVC and Glass Coated with Titanium Dioxide Nanoparticles by XTT Method and ATPase Assay ». Bratislavske Lekarske Listy 113(12): 707-11.

Hamdaoui, Quentin et al. 2021. « Metrological Characterization of an Aerosol Exposure Chamber to Explore the Inhalation Effects of the Combination of Paraquat and TiO2 Nano-Objects ». Aerosol and Air Quality Research 21: 200626-200626.

Han, Zhaoxiang, Jiaying Li, Wei Bao, et Jiahong Wang. 2012. « Enhanced Toxicity of Atrazine to Daphnia Magna in the Presence of Nano-CeO 2 ». Chinese Journal of Geochemistry 31(3): 297-302.

Handy, Richard D., Richard Owen, et Eugenia Valsami-Jones. 2008. « The Ecotoxicology of Nanoparticles and Nanomaterials: Current Status, Knowledge Gaps, Challenges, and Future Needs ». Ecotoxicology 17(5): 315-25.

Hardy, CJ. 1980. « Hardy CJ, Clark GC, Woolen BH & Laird W (1980) Assessment of accumulation of paraquat in the lungs. Department of Inhalation Toxicology, Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire & ICI Ltd, CTL. Unpublished. »

Hatch, G. E., J. A. Raub, et J. A. Graham. 1984. « Functional and Biochemical Indicators of Pneumoconiosis in Mice: Comparison with Rats ». J. Toxicol. Environ. Health; (United States) 13:4-6. https://www.osti.gov/biblio/5927501 (6 avril 2021).

Hathaway, Q.A. et al. 2017. « Maternal-engineered nanomaterial exposure disrupts progeny cardiac function and bioenergetics ». American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 312(3): H446-58.

Hathway, D. 1966. « Hathaway D (1966) Report to ICI Ltd: acute aerosol inhalation toxicity study on paraquat dichloride. Industrial Bio-Test Laboratories Inc. 26 January 1966. Unpublished. »

Hawkes, C. H., K. del Tredici, et H. Braak. 2009. « Parkinson's Disease: The Dual Hit Theory Revisited. » Annals of the New York Academy of Sciences 1170: 615-22.

Hawkins, Simon J. et al. 2018. « Nanoparticle-Induced Neuronal Toxicity across Placental Barriers Is Mediated by Autophagy and Dependent on Astrocytes ». Nature Nanotechnology 13(5): 427-33.

He, Qiong et al. 2018. « Titanium dioxide nanoparticles induce mouse hippocampal neuron apoptosis via oxidative stress- and calcium imbalance-mediated endoplasmic reticulum stress ». Environmental Toxicology and Pharmacology 63: 6-15.

Heusinkveld, Harm J. et al. 2016. « Neurodegenerative and Neurological Disorders by Small Inhaled Particles ». NeuroToxicology 56: 94-106.

Heylings, JR. 1992. « Heylings JR & Farnworth MJ (1992) Paraquat: acute oral toxicity and absorption in the mouse. Report no. CTL/R/1119. Lab/sponsor: ICI Central Toxicity Laboratory, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, UK. Unpublished ».

Hilz, Emilia, et Arnoldus W. P. Vermeer. 2013. « Spray Drift Review: The Extent to Which a Formulation Can Contribute to Spray Drift Reduction ». Crop Protection 44: 75-83.

Hoet, Peter H. M., Christian P. L. Lewis, Maurits Demedts, et Benoit Nemery. 1994. « Putrescine and Paraquat Uptake in Human Lung Slices and Isolated Type II Pneumocytes ». Biochemical Pharmacology 48(3): 517-24.

Hogberg, Helena T. et al. 2009. « Gene Expression as a Sensitive Endpoint to Evaluate Cell Differentiation and Maturation of the Developing Central Nervous System in Primary Cultures of Rat Cerebellar Granule Cells (CGCs) Exposed to Pesticides ». Toxicology and Applied Pharmacology 235(3): 268-86.

Hong, Fashui et al. 2005. « Effect of Nano-TiO2 on Photochemical Reaction of Chloroplasts of Spinach ». Biological Trace Element Research 105(1-3): 269-79.

Hong, Fashui et al. 2018. « Nano-TiO2 Inhibits Development of the Central Nervous System and Its Mechanism in Offspring Mice ». Journal of Agricultural and Food Chemistry 66(44): 11767-74.

Hougaard, Karin Sørig et al. 2015. « A Perspective on the Developmental Toxicity of Inhaled Nanoparticles ». Reproductive Toxicology 56: 118-40.

Hougaard, K.S. et al. 2010. « Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice ». Particle and Fibre Toxicology 7.

Hsu, Ruby et al. 2007. « Nogo Receptor 1 (RTN4R) as a Candidate Gene for Schizophrenia: Analysis Using Human and Mouse Genetic Approaches ». PLOS ONE 2(11): e1234.

Hu, Ji, Demin Wang, Brett E. Forthaus, et Jianmin Wang. 2012. « Quantifying the Effect of Nanoparticles on As(V) Ecotoxicity Exemplified by Nano-Fe2O3 (Magnetic) and Nano-Al2O3 ». Environmental Toxicology and Chemistry 31(12): 2870-76.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, et World Health Organization, éd. 2010. Painting, Firefighting, and Shiftwork. Lyon, France : Geneva: International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press.

Ikegame, Tempei et al. 2013. « DNA Methylation of the BDNF Gene and Its Relevance to Psychiatric Disorders ». Journal of Human Genetics 58(7): 434-38.

Ingebrigtsen, K, Nafstad I, et Andersen Ra. 1984. « Distribution and Transplacental Transfer of Paraquat in Rats and Guinea-Pigs. » General Pharmacology 15(3): 201-4.

Ingebrigtsen, K., I. Nafstad, et R.A. Andersen. 1984. « Distribution and Transplacental Transfer of Paraquat in Rats and Guinea-Pigs ». General Pharmacology: The Vascular System 15(3): 201-4.

INERIS (2004) Rapport d'étude 11/05/2004 : https://www.ineris.fr/sites/ineris.fr/files/contribution/Documents/AIRE_04_0401.pdf (28 février 2021).

INSERM (2013). « INSERM expertise collective : Pesticides Effets sur la santé ». Inserm - La science pour la santé. https://www.inserm.fr/information-en-sante/expertises-collectives/pesticides-effets-sur-sante (20 septembre 2020).

« ISO/TS 80004-1:2015(fr), Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 1: Termes "coeur" ». https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:fr (20 avril 2021).

Jang, Hee Dong, et Seong-Kil Kim. 2001. « Controlled Synthesis of Titanium Dioxide Nanoparticles in a Modified Diffusion Flame Reactor ». Materials Research Bulletin 36(3): 627-37.

Jarabek, Annie M., Bahman Asgharian, et Frederick J. Miller. 2005. « Dosimetric Adjustments for Interspecies Extrapolation of Inhaled Poorly Soluble Particles (PSP) ». Inhalation Toxicology 17(7-8): 317-34.

Jayaraj, Richard L., Eric A. Rodriguez, Yi Wang, et Michelle L. Block. 2017. « Outdoor Ambient Air Pollution and Neurodegenerative Diseases: The Neuroinflammation Hypothesis ». Current Environmental Health Reports 4(2): 166-79.

Jeon, KiSoo, Il Je Yu, et Kang-Ho Ahn. 2012. « Evaluation of Newly Developed Nose-Only Inhalation Exposure Chamber for Nanoparticles ». Inhalation Toxicology 24(9): 550-56.

Jeon, Yu-Mi, Seul-Ki Park, et Mi-Young Lee. 2011. « Toxicoproteomic identification of TiO2 nanoparticle-induced protein expression changes in mouse brain ». Animal Cells and Systems 15(2): 107-14.

Jiang, Jingkun, Günter Oberdörster, et Pratim Biswas. 2009. « Characterization of Size, Surface Charge, and Agglomeration State of Nanoparticle Dispersions for Toxicological Studies ». Journal of Nanoparticle Research 11(1): 77-89.

Jiao, Yun, Lu Lu, Robert W. Williams, et Richard J. Smeyne. 2012. « Genetic Dissection of Strain Dependent Paraquat-Induced Neurodegeneration in the Substantia Nigra Pars Compacta ». PLOS ONE 7(1): e29447.

Jomova, K., D. Vondrakova, M. Lawson, et M. Valko. 2010. « Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders ». Molecular and Cellular Biochemistry 345(1-2): 91-104.

Judy, Jonathan D., Jason M. Unrine, et Paul M. Bertsch. 2011. « Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain ». Environmental Science & Technology 45(2): 776-81.

Junien, Claudine et al. 2016. « [The new paradigm of the developmental origin of health and diseases (DOHaD)--Epigenetics and environment: evidence and missing links] ». Medecine Sciences: M/S 32(1): 27-34.

K, Gerloff et al. 2012. « Distinctive Toxicity of TiO2 Rutile/Anatase Mixed Phase Nanoparticles on Caco-2 Cells ». Chemical research in toxicology 25(3). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22263745/ (9 avril 2021).

Kah, M. et al. 2014. « Analysing the fate of nanopesticides in soil and the applicability of regulatory protocols using a polymer-based nanoformulation of atrazine ». Environmental Science and Pollution Research 21(20): 11699-707.

Kah, M. et al. 2015. « Nanopesticides and nanofertilizers: Emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? » Frontiers in Chemistry 3(NOV).

Kah, M., S. Beulke, K. Tiede, et T. Hofmann. 2013. « Nanopesticides: State of knowledge, environmental fate, and exposure modeling ». Critical Reviews in Environmental Science and Technology 43(16): 1823-67.

Kah, M., R.S. Kookana, A. Gogos, et T.D. Bucheli. 2018. « A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues ». Nature Nanotechnology 13(8): 677-84.

Kah, Melanie, Nathalie Tufenkji, et Jason C. White. 2019. « Nano-Enabled Strategies to Enhance Crop Nutrition and Protection ». Nature Nanotechnology 14(6): 532-40.

Kalia, Lorraine V., et Anthony E. Lang. 2015. « Parkinson's Disease ». The Lancet 386(9996): 896-912.

Kamel, F. et al. 2007. « Pesticide Exposure and Self-Reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study ». American Journal of Epidemiology 165(4): 364-74.

Kang, Min Jeong, Suk Ju Gil, et Hyun Chul Koh. 2009. « Paraquat Induces Alternation of the Dopamine Catabolic Pathways and Glutathione Levels in the Substantia Nigra of Mice ». Toxicology Letters 188(2): 148-52.

Kaufmann, Horacio, et David S. Goldstein. 2010. « Pure Autonomic Failure: A Restricted Lewy Body Synucleinopathy or Early Parkinson Disease? » Neurology 74(7): 536-37.

Kawasaki, H. 2017. « A mechanistic review of particle overload by titanium dioxide ». Inhalation Toxicology 29(12-14): 530-40.

Khacho, Mireille et al. 2017. « Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis ». Human Molecular Genetics 26(17): 3327-41.

Khacho, Mireille, et Ruth S. Slack. 2018. « Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Neurogenesis: From Development to the Adult Brain ». Developmental Dynamics 247(1): 47-53.

Khan, I., K. Saeed, et I. Khan. 2019. « Nanoparticles: Properties, applications and toxicities ». Arabian Journal of Chemistry 12(7): 908-31.

Khin, Mya Mya et al. 2012. « A Review on Nanomaterials for Environmental Remediation ». Energy & Environmental Science 5(8): 8075-8109.

Kim, C S, et T C Kang. 1997. « Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease. » American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 155(3): 899-905.

Kim, Jin Kwon et al. 2021. « Lung Retention and Particokinetics of Silver and Gold Nanoparticles in Rats Following Subacute Inhalation Co-Exposure ». Particle and Fibre Toxicology 18(1): 5.

Kim, Seong C. et al. 2010. « A nanoparticle dispersion method for in vitro and in vivo nanotoxicity study ». Nanotoxicology 4(1): 42-51.

Kimbrough, R. D., et T. B. Gaines. 1970. « Toxicity of Paraquat to Rats and Its Effect on Rat Lungs ». Toxicology and Applied Pharmacology 17(3): 679-90.

King, Suzanne, et David P. Laplante. 2005. « The effects of prenatal maternal stress on children's cognitive development: Project Ice Storm ». Stress 8(1): 35-45.

Klocke, Carolyn et al. 2018. « Enhanced cerebellar myelination with concomitant iron elevation and ultrastructural irregularities following prenatal exposure to ambient particulate matter in the mouse ». Inhalation Toxicology 30(9-10): 381-96.

Koivisto, Antti J. et al. 2011. « Aerosol Characterization and Lung Deposition of Synthesized TiO2 Nanoparticles for Murine Inhalation Studies ». Journal of Nanoparticle Research 13(7): 2949-61.

Konthonbut, Pajaree et al. 2018. « Paraquat Exposure of Pregnant Women and Neonates in Agricultural Areas in Thailand ». International Journal of Environmental Research and Public Health 15(6). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6025106/ (19 mars 2019).

Kookana, Rai S. et al. 2014. « Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks ». Journal of Agricultural and Food Chemistry 62(19): 4227-40.

Kose, Ozge et al. 2020. « Impact of the Physicochemical Features of TiO2 Nanoparticles on Their In Vitro Toxicity ». Chemical Research in Toxicology 33(9): 2324-37.

Koullapis, P. G., S. C. Kassinos, M. P. Bivolarova, et A. K. Melikov. 2016. « Particle Deposition in a Realistic Geometry of the Human Conducting Airways: Effects of Inlet Velocity Profile, Inhalation Flowrate and Electrostatic Charge ». Journal of Biomechanics 49(11): 2201-12.

Kreyling, W. G. et al. 2002. « Translocation of Ultrafine Insoluble Iridium Particles from Lung Epithelium to Extrapulmonary Organs Is Size Dependent but Very Low ». Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 65(20): 1513-30.

Kreyling, Wolfgang G. 2016. « Discovery of Unique and ENM— Specific Pathophysiologic Pathways: Comparison of the Translocation of Inhaled Iridium Nanoparticles from Nasal Epithelium versus Alveolar Epithelium towards the Brain of Rats ». Toxicology and Applied Pharmacology 299: 41-46.

Kreyling, Wolfgang G., Uwe Holzwarth, Nadine Haberl, et al. 2017. « Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intratracheal instillation in rats: Part 3 ». Nanotoxicology 11(4): 454-64.

Kreyling, Wolfgang G., Uwe Holzwarth, Carsten Schleh, et al. 2017. « Quantitative Biokinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles after Oral Application in Rats: Part 2 ». Nanotoxicology 11(4): 443-53.

Kreyling, Wolfgang G., Manuela Semmler-Behnke, Shinji Takenaka, et Winfried Möller. 2013. « Differences in the Biokinetics of Inhaled Nano- versus Micrometer-Sized Particles ». Accounts of Chemical Research 46(3): 714-22.

Krystek, Petra et al. 2014. « Method Development and Inter-Laboratory Comparison about the Determination of Titanium from Titanium Dioxide Nanoparticles in Tissues by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ». Analytical and Bioanalytical Chemistry 406(16): 3853-61.

Kubo-Irie, Miyoko et al. 2016. « The transfer of titanium dioxide nanoparticles from the host plant to butterfly larvae through a food chain ». Scientific Reports 6. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4814876/ (12 février 2021).

Kühnel, Dana, Steffi Böhme, et Rolf Altenburger. 2018. « Environmental mixtures of nanomaterials and chemicals: The Trojan-horse phenomenon and its relevance for ecotoxicity ». Science of The Total Environment 635.

Kumar, Ashutosh et al. 2012. « Involvement of NADPH Oxidase and Glutathione in Zinc-Induced Dopaminergic Neurodegeneration in Rats: Similarity with Paraquat Neurotoxicity ». Brain Research 1438: 48-64.

Kumar, Majeti N. V. Ravi. 2000. « Nano and microparticles as controlled drug delivery devices ». Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.

Kuroda, Yukiko et al. 2012. « Parkin interacts with Klokin1 for mitochondrial import and maintenance of membrane potential ». Human Molecular Genetics 21(5): 991-1003.

Laborde, J. C. 2006. « The behaviour of aerosols: from installation to environment; Le comportement des aerosols: de l'installation a l'environnement ». https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/21112868 (22 février 2021).

Laird, WJD. 1979. « Laird WJD, Moore DJ & Woolen BH (1979) Paraquat concentrations in rat lungs following exposure to paraquat aerosols. ICI Ltd, CTL, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, UK. Report no: CTL/P/460. Unpublished. »

Larese Filon, Francesca et al. 2015. « Nanoparticles Skin Absorption: New Aspects for a Safety Profile Evaluation ». Regulatory Toxicology and Pharmacology 72(2): 310-22.

Larsen, Ashley E., Steven D. Gaines, et Olivier Deschênes. 2017. « Agricultural Pesticide Use and Adverse Birth Outcomes in the San Joaquin Valley of California ». Nature Communications 8(1): 302.

Lau, Anthony, et Michael Tymianski. 2010. « Glutamate Receptors, Neurotoxicity and Neurodegeneration ». Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 460(2): 525-42.

Lee, Ji Hyun et al. 2011. « Exposure Assessment of Workplaces Manufacturing Nanosized TiO2 and Silver ». Inhalation Toxicology 23(4): 226-36.

Lee, Jin Wuk et al. 2016. « Effects of Multi-Walled Carbon Nanotube (MWCNT) on Antioxidant Depletion, the ERK Signaling Pathway, and Copper Bioavailability in the Copepod (Tigriopus Japonicus) ». Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands) 171: 9-19.

Leprince, Marine et al. 2019. « L'imagerie élémentaire par spectroscopie LIBS - De nouvelles applications en médecine ». médecine/sciences 35(8-9): 682-88.

« Les pesticides dans l'air francilien - Partie II ». AIRPARIF 2016: 85.

Li, Mengting et al. 2016. « Arsenate Accumulation, Distribution, and Toxicity Associated with Titanium Dioxide Nanoparticles in Daphnia Magna ». Environmental Science & Technology 50(17): 9636-43.

Li, Xiaoming et al. 2015. « Effects of Physicochemical Properties of Nanomaterials on Their Toxicity ». Journal of Biomedical Materials Research Part A 103(7): 2499-2507.

Li, Zhu-Zhu et al. 2007. « Study of UV-Shielding Properties of Novel Porous Hollow Silica Nanoparticle Carriers for Avermectin ». Pest Management Science 63(3): 241-46.

Liou, Saou-Hsing et al. 2015. « Assessing the First Wave of Epidemiological Studies of Nanomaterial Workers ». Journal of Nanoparticle Research 17(10): 413.

Litteljohn, Darcy, Eric Nelson, Cheri Bethune, et Shawn Hayley. 2011. « The Effects of Paraquat on Regional Brain Neurotransmitter Activity, Hippocampal BDNF and Behavioural Function in Female Mice ». Neuroscience Letters 502(3): 186-91.

Liu, Huiting et al. 2009. « Biochemical Toxicity of Nano-Anatase TiO2 Particles in Mice ». Biological Trace Element Research 129(1): 170-80.

Liu, Jie, et Wen-Xiong Wang. 2015. « Reduced Cadmium Accumulation and Toxicity in Daphnia Magna under Carbon Nanotube Exposure ». Environmental Toxicology and Chemistry 34(12): 2824-32.

Liu, K., X. Lin, et J. Zhao. 2013. « Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors ». International Journal of Nanomedicine 8: 2509-20.

Liu, Xiaoxia et al. 2014. « A Functionalized Fluorescent Dendrimer as a Pesticide Nanocarrier: Application in Pest Control ». Nanoscale 7(2): 445-49.

Liu, Zhaowei, Guogang Ren, Tao Zhang, et Zhuo Yang. 2009. « Action Potential Changes Associated with the Inhibitory Effects on Voltage-Gated Sodium Current of Hippocampal CA1 Neurons by Silver Nanoparticles ». Toxicology 264(3): 179-84.

Livak, Kenneth J., et Thomas D. Schmittgen. 2001. « Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method ». Methods 25(4): 402-8.

Lochhead, Jeffrey J., Daniel J. Wolak, Michelle E. Pizzo, et Robert G. Thorne. 2015. « Rapid Transport within Cerebral Perivascular Spaces Underlies Widespread Tracer Distribution in the Brain after Intranasal Administration ». Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 35(3): 371-81.

Lock, Edward A, et Martin F Wilks. 2010. « Chapter 83 - Paraquat ». In Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition), éd. Robert Krieger. New York: Academic Press, 1771-1827. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123743671000835 (22 février 2021).

Loewenherz, C. et al. 1997. « Biological Monitoring of Organophosphorus Pesticide Exposure among Children of Agricultural Workers in Central Washington State ». Environmental Health Perspectives 105(12): 1344-53.

Löndahl, Jakob et al. 2007. « Size-Resolved Respiratory-Tract Deposition of Fine and Ultrafine Hydrophobic and Hygroscopic Aerosol Particles During Rest and Exercise ». Inhalation Toxicology 19(2): 109-16.

Long Thomas C. et al. 2007. « Nanosize Titanium Dioxide Stimulates Reactive Oxygen Species in Brain Microglia and Damages Neurons in Vitro ». Environmental Health Perspectives 115(11): 1631-37.

Love, Michael I., Simon Anders, Vladislav Kim, et Wolfgang Huber. 2015. « RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression ». F1000Research 4. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4670015/ (25 janvier 2021).

Love, Michael I., Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. « Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 ». Genome Biology 15(12): 550.

Lowry, Gregory V., Astrid Avellan, et Leanne M. Gilbertson. 2019. « Opportunities and Challenges for Nanotechnology in the Agri-Tech Revolution ». Nature Nanotechnology 14(6): 517-22.

Lozowicka, Bozena. 2015. « Health Risk for Children and Adults Consuming Apples with Pesticide Residue ». Science of The Total Environment 502: 184-98.

Lu, C., R.A. Fenske, N.J. Simcox, et D. Kalman. 2000. « Pesticide exposure of children in an agricultural community: Evidence of household proximity to farmland and take home exposure pathways ». Environmental Research 84(3): 290-302.

Lucci, Francesco et al. 2020. « Experimental and computational investigation of a nose-only exposure chamber ». Aerosol Science and Technology 54(3): 277-90.

Luk, Kelvin C., Victoria M. Kehm, Bin Zhang, et al. 2012. « Intracerebral inoculation of pathological α-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α-synucleinopathy in mice ». Journal of Experimental Medicine 209(5): 975-86.

Luk, Kelvin C., Victoria Kehm, Jenna Carroll, et al. 2012. « Pathological α-Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice ». Science 338(6109): 949-53.

Lundqvist, Martin et al. 2008. « Nanoparticle Size and Surface Properties Determine the Protein Corona with Possible Implications for Biological Impacts ». Proceedings of the National Academy of Sciences 105(38): 14265-70.

Luo, Yu, Alan Hoffer, Barry Hoffer, et Xin Qi. 2015. « Mitochondria: A Therapeutic Target for Parkinson's Disease? » International Journal of Molecular Sciences 16(9): 20704-30.

Lv, Jitao, Peter Christie, et Shuzhen Zhang. 2019. « Uptake, Translocation, and Transformation of Metal-Based Nanoparticles in Plants: Recent Advances and Methodological Challenges ». Environmental Science: Nano 6(1): 41-59.

M., Evy Alice Abigail, et Ramalingam Chidambaram. 2016. « Rice Husk as a Low Cost Nanosorbent for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Removal from Aqueous Solutions ». Ecological Engineering 92: 97-105.

Ma, Linglan et al. 2010. « Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO2 delivered to the abdominal cavity ». Biomaterials 31(1): 99-105.

Ma, Taowu, Meng Wang, Shuangjiao Gong, et Bin Tian. 2017. « Impacts of Sediment Organic Matter Content and PH on Ecotoxicity of Coexposure of TiO 2 Nanoparticles and Cadmium to Freshwater Snails Bellamya Aeruginosa ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology 72(1): 153-65.

MacFarland, Harold N. 1983. « Designs and Operational Characteristics of Inhalation Exposure Equipment — A Review ». Fundamental and Applied Toxicology 3(6): 603-13.

Magos, L. 1989. « Roger O. McClellan and Rogene F. Henderson (Eds). Concepts in Inhalation Toxicology. Hemisphere Publishing, New York, 1989; 560 Pp. £63.00 ». Journal of Applied Toxicology 9(5): 362-362.

Maher, Barbara A. et al. 2016. « Magnetite Pollution Nanoparticles in the Human Brain ». Proceedings of the National Academy of Sciences 113(39): 10797-801.

Ma-Hock, Lan et al. 2009. « Development of a Short-Term Inhalation Test in the Rat Using Nano-Titanium Dioxide as a Model Substance ». Inhalation Toxicology 21(2): 102-18.

Maier, Monika, Bernd Hannebauer, Henning Holldorff, et Peter Albers. 2006. « Does Lung Surfactant Promote Disaggregation of Nanostructured Titanium Dioxide? » Journal of Occupational and Environmental Medicine 48(12): 1314-20.

Mainelis, G. et al. 2013. « Characterization and Application of a Nose-Only Exposure Chamber for Inhalation Delivery of Liposomal Drugs and Nucleic Acids to Mice ». Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery 26(6): 345-54.

Mandler, W. Kyle et al. 2019. « Mouse Pulmonary Response to Dust from Sawing Corian®, a Solid-Surface Composite Material ». Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 82(11): 645-63.

Manke, Amruta, Liying Wang, et Yon Rojanasakul. 2013. « Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity ». BioMed Research International 2013: 942916.

Manning-Bog, A.B. et al. 2002. « The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of α-synuclein in mice: Paraquat and α-synuclein ». Journal of Biological Chemistry 277(3): 1641-44.

Marimuthu, Sampath et al. 2013. « Acaricidal Activity of Synthesized Titanium Dioxide Nanoparticles Using Calotropis Gigantea against Rhipicephalus Microplus and Haemaphysalis Bispinosa ». Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 6(9): 682-88.

Masuda-Suzukake, Masami et al. 2013. « Prion-like Spreading of Pathological α-Synuclein in Brain ». Brain: A Journal of Neurology 136(Pt 4): 1128-38.

May, Scott. 2012. « Sunscreen Compositions for Application to Plants ». https://patents.google.com/patent/CA2741872A1/en (14 février 2021).

McCormack, A. L., J. G. Atienza, J. W. Langston, et D. A. Di Monte. 2006. « Decreased Susceptibility to Oxidative Stress Underlies the Resistance of Specific Dopaminergic Cell Populations to Paraquat-Induced Degeneration ». Neuroscience 141(2): 929-37.

McCormack, Alison L. et al. 2002. « Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: Selective Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat ». Neurobiology of Disease 10(2): 119-27.

McCormack, Alison L. et al. 2005. « Role of Oxidative Stress in Paraquat-Induced Dopaminergic Cell Degeneration ». Journal of Neurochemistry 93(4): 1030-37.

Merico, Daniele et al. 2010. « Enrichment Map: A Network-Based Method for Gene-Set Enrichment Visualization and Interpretation ». PloS One 5(11): e13984.

Mesterházy, Ákos, Judit Oláh, et József Popp. 2020. « Losses in the Grain Supply Chain: Causes and Solutions ». Sustainability 12(6): 2342.

Meyer, J. P, et F. Horwat. 1998. « Débit ventilatoire de travail ». INRS (76): Doc. pour méd. Trav. 343-50.

Migdal, Camille, et Mireille Serres. 2011. « Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant ». médecine/sciences 27(4): 405-12.

Miller, Gary Wright. 2007. « Paraquat: The Red Herring of Parkinson's Disease Research ». Toxicological Sciences 100(1): 1-2.

Mittra, Namrata et al. 2020. « Postnatal Zinc or Paraquat Administration Increases Paraquat or Zinc-Induced Loss of Dopaminergic Neurons: Insight into Augmented Neurodegeneration ». Molecular and Cellular Biochemistry. https://doi.org/10.1007/s11010-020-03694-x (17 février 2020).

Moisan, Frédéric et al. 2015. « Association of Parkinson's Disease and Its Subtypes with Agricultural Pesticide Exposures in Men: A Case–Control Study in France ». Environmental Health Perspectives 123(11): 1123-29.

Montazer, Majid, et Samira Seifollahzadeh. 2011. « Enhanced Self-Cleaning, Antibacterial and UV Protection Properties of Nano TiO2 Treated Textile through Enzymatic Pretreatment ». Photochemistry and Photobiology 87(4): 877-83.

Mooney, Michael A., et Beth Wilmot. 2015. « Gene Set Analysis: A Step-by-Step Guide ». American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics 168(7): 517-27.

Mora-Lorca, José Antonio et al. 2016. « Glutathione Reductase Gsr-1 Is an Essential Gene Required for Caenorhabditis Elegans Early Embryonic Development ». Free Radical Biology and Medicine 96: 446-61.

Morgan, Marsha K. et al. 2005. « Exposures of Preschool Children to Chlorpyrifos and Its Degradation Product 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol in Their Everyday Environments ». Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology 15(4): 297-309.

Morimoto, Yasuo et al. 2011. « Investigation of Gene Expression of MMP-2 and TIMP-2 MRNA in Rat Lung in Inhaled Nickel Oxide and Titanium Dioxide Nanoparticles ». Industrial Health 49(3): 344-52.

Morishita, Yuki, Yasuo Yoshioka, Kazuma Higashisaka, et Yasuo Tsutsumi. 2016. « Reproductive and Developmental Effects of Nanomaterials ». In Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances, Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, éd. Takemi Otsuki, Yasuo Yoshioka, et Andrij Holian. Tokyo: Springer Japan, 77-101. http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-55732-6_4 (23 avril 2021).

Morozova, Olena, Martin Hirst, et Marco A. Marra. 2009. « Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis ». Annual Review of Genomics and Human Genetics 10(1): 135-51.

Morris-Schaffer, Keith et al. 2019. « Effects of Neonatal Inhalation Exposure to Ultrafine Carbon Particles on Pathology and Behavioral Outcomes in C57BL/6J Mice ». Particle and Fibre Toxicology 16. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6379948/ (27 mars 2021).

Morshed, M.M. et al. 2010. « Airborne paraquat measurement and its exposure to spray operators in treated field environment ». International Journal of Agriculture and Biology 12(5): 679-84.

Myojo, Toshihiko et al. 2011. « Monitoring of C60 Aerosol Concentrations during 4-Week Inhalation Study Using a Carbon Aerosol Analyzer with Adjusted Analytical Protocol ». Journal of Nanoparticle Research 13(5): 2063-71.

Naasz, Steffi, Rolf Altenburger, et Dana Kühnel. 2018. « Environmental Mixtures of Nanomaterials and Chemicals: The Trojan-Horse Phenomenon and Its Relevance for Ecotoxicity ». Science of The Total Environment 635: 1170-81.

« Nanomaterials Definition Matters ». 2019. Nature Nanotechnology 14(3): 193-193. https://doi.org/10.1038/s41565-019-0412-3

Naudet, Nicolas et al. 2017. « Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α-Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α-Synuclein Transgenic Mice ». Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 76(12): 1046-57.

Naughton, Carol, Daniel O'Toole, Deniz Kirik, et Eilís Dowd. 2017. « Interaction between Subclinical Doses of the Parkinson's Disease Associated Gene, α-Synuclein, and the Pesticide, Rotenone, Precipitates Motor Dysfunction and Nigrostriatal Neurodegeneration in Rats ». Behavioural Brain Research 316: 160-68.

Nel, Andre, Tian Xia, Lutz Mädler, et Ning Li. 2006. « Toxic Potential of Materials at the Nanolevel ». Science 311(5761): 622-27.

Nicosia, Angelo et al. 2021. « TiO 2-Based Nanocomposites Thin Film Having Boosted Photocatalytic Activity for Xenobiotics Water Pollution Remediation ». Nanomaterials (Basel, Switzerland) 11(2). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33557321/ (30 avril 2021).

Nieto, Rodrigo, Manuel Kukuljan, et Hernan Silva. 2013. « BDNF and Schizophrenia: From Neurodevelopment to Neuronal Plasticity, Learning, and Memory ». Frontiers in Psychiatry 4. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsyt.2013.00045/full (17 avril 2021).

Nishimori, H. et al. 2009. « Influence of 70 Nm Silica Particles in Mice with Cisplatin or Paraquat-Induced Toxicity ». Die Pharmazie 64(6): 395-97.

Nist, Marliese Dion, et Rita H. Pickler. 2019. « An Integrative Review of Cytokine/Chemokine Predictors of Neurodevelopment in Preterm Infants ». Biological Research for Nursing 21(4): 366-76.

Noël, Alexandra. 2013. « Influence de la taille de départ, de l'état d'agglomération et de la dose de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO2) inhalées sur la réponse pulmonaire chez le rat ». https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/10121 (30 mars 2021).

Norris, Erin H., et Benoit I. Giasson. 2005. « Role of Oxidative Damage in Protein Aggregation Associated with Parkinson's Disease and Related Disorders ». Antioxidants & Redox Signaling 7(5-6): 672-84.

Oberdörster G et al. 1992. « Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. » Environmental Health Perspectives 97: 193-99.

Oberdörster, G. 2000. « Toxicology of Ultrafine Particles: In vivo Studies ». Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 358(1775): 2719-40.

Oberdörster, G. et al. 2004. « Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain ». Inhalation Toxicology 16(6-7): 437-45.

Oberdörster, G. Eva Oberdörster, et Jan Oberdörster. 2005. « Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles ». Environmental Health Perspectives 113(7): 823-39.

Oberdörster, G. et al. 2010. « Safety Assessment for Nanotechnology and Nanomedicine: Concepts of Nanotoxicology ». Journal of Internal Medicine 267(1): 89-105.

Oberdörster, G. Vincent Castranova, Bahman Asgharian, et Phil Sayre. 2015. « Inhalation Exposure to Carbon Nanotubes (CNT) and Carbon Nanofibers (CNF): Methodology and Dosimetry ». Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 18(3-4): 121-212.

Oberdörster, Günter, et Thomas A. J. Kuhlbusch. 2018. « In Vivo Effects: Methodologies and Biokinetics of Inhaled Nanomaterials ». NanoImpact 10: 38-60.

OECD (2009), Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-403-acute-inhalation-toxicity_9789264070608-en.

OECD (2018), Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-412-subacute-inhalation-toxicity-28-day-study_9789264070783-en.

OECD (2018), Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-413-subchronic-inhalation-toxicity-90-day-study_9789264070806-en.

OECD (2007), Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-426-developmental-neurotoxicity-study_9789264067394-en.

OECD (2018) Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris. https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/test-no-452-chronic-toxicity-studies_9789264071209-en.

Oczkowska, Anna, Wojciech Kozubski, Margarita Lianeri, et Jolanta Dorszewska. 2013. « Mutations in PRKN and SNCA Genes Important for the Progress of Parkinson's Disease ». Current Genomics 14(8): 502-17.

O'Donnell, K., T. G. O'Connor, et V. Glover. 2009. « Prenatal Stress and Neurodevelopment of the Child: Focus on the HPA Axis and Role of the Placenta ». Developmental Neuroscience 31(4): 285-92.

Ohtani, B., O.O. Prieto-Mahaney, D. Li, et R. Abe. 2010. « What Is Degussa (Evonik) P25? Crystalline Composition Analysis, Reconstruction from Isolated Pure Particles and Photocatalytic Activity Test ». Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 216(2-3): 179-82.

Okada, Takami et al. 2019. « Inhalation of Titanium Dioxide (P25) Nanoparticles to Rats and Changes in Surfactant Protein (SP-D) Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Serum ». Nanotoxicology 13(10): 1396-1408.

Oldham, Michael J., Robert F. Phalen, et Thomas Budiman. 2009. « Comparison of Predicted and Experimentally Measured Aerosol Deposition Efficiency in BALB/C Mice in a New Nose-Only Exposure System ». Aerosol Science and Technology 43(10): 970-77.

Oldham, Michael J., Robert F. Phalen, Risa J. Robinson, et Michael T. Kleinman. 2004. « Performance of a Portable Whole-Body Mouse Exposure System ». Inhalation Toxicology 16(9): 657-62.

« OSHA Occupational Chemical Database | Occupational Safety and Health Administration ». https://www.osha.gov/chemicaldata/chemResult.html?RecNo=375 (22 février 2021).

O'Shaughnessy, Patrick T., Chandran Achutan, Marsha E. O'Neill, et Peter S. Thorne. 2003. « A Small Whole-Body Exposure Chamber for Laboratory Use ». Inhalation Toxicology 15(3): 251-63.

Osier, M., et G. Oberdörster. 1997. « Intratracheal Inhalation vs Intratracheal Instillation: Differences in Particle Effects ». Fundamental and Applied Toxicology 40(2): 220-27.

Oyabu, T. et al. 2007. « Biopersistence of Inhaled Nickel Oxide Nanoparticles in Rat Lung ». Inhalation Toxicology 19(sup1): 55-58.

Oyabu, Takako et al. 2016. « Comparison between whole-body inhalation and nose-only inhalation on the deposition and health effects of nanoparticles ». Environmental Health and Preventive Medicine 21(1): 42-48.

Pang, Yaohong, David L MacIntosh, David E Camann, et P Barry Ryan. 2002. « Analysis of aggregate exposure to chlorpyrifos in the NHEXAS-Maryland investigation. » Environmental Health Perspectives 110(3): 235-40.

« Paraquat and diquat (EHC 39, 1984) ». http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc39.htm (3 mars 2021).

Patashnik, H., et G. Rupprecht. 1990. « PM-10 Measurements Using the Tapered Element Oscillating Microbalance ». Clean Air: Journal of the Clean Air Society of Australia and New Zealand. https://search.informit.org/doi/abs/10.3316/INFORMIT.170065684688467 (28 février 2021).

Pateiro-Moure, Mirian et al. 2009. « Effect of Organic Matter and Iron Oxides on Quaternary Herbicide Sorption–Desorption in Vineyard-Devoted Soils ». Journal of Colloid and Interface Science 333(2): 431-38.

Paul, Emmanuel. 2016. « Nanoparticules manufacturées : translocation et impact pulmonaire d'une exposition par voie respiratoire durant la gestation dans un modèle murin ». These de doctorat. Paris Est. http://www.theses.fr/2016PESC1019 (25 avril 2021).

Pauluhn, J. 1994. « Validation of an Improved Nose-Only Exposure System for Rodents ». Journal of applied toxicology: JAT 14(1): 55-62.

Pauluhn, J., et U. Mohr. 1999. « Repeated 4-Week Inhalation Exposure of Rats: Effect of Low-, Intermediate, and High-Humidity Chamber Atmospheres ». Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie 51(2): 178-87.

Peng, Jun et al. 2007. « Iron and Paraquat as Synergistic Environmental Risk Factors in Sporadic Parkinson's Disease Accelerate Age-Related Neurodegeneration ». The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 27(26): 6914-22.

Pérez-de-Luque, Alejandro, et Diego Rubiales. 2009. « Nanotechnology for Parasitic Plant Control ». Pest Management Science 65(5): 540-45.

Perlatti, Bruno et al. 2013. « Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals ». Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies: undefined-undefined.

Peters, Ruud et al. 2014. « Inventory of Nanotechnology Applications in the Agricultural, Feed and Food Sector ». EFSA Supporting Publications 11(7): 621E.

Phalen, Robert F. 2009. Inhalation Studies: Foundations and Techniques. New York: Informa Healthcare. http://www.crcnetbase.com/isbn/9780849314001 (22 février 2021).

Phalen, Robert, Loyda Méndez, et Michael Oldham. 2014. « Nose-Only Aerosol Exposure Systems: Design, Operation, and Performance ». In , 43-56.

Phuinthiang, Patcharaporn, et Puangrat Kajitvichyanukul. 2018. « Degradation of paraquat from contaminated water using green TiO2 nanoparticles synthesized from Coffea arabica L. in photocatalytic process ». Water Science and Technology 79(5): 905-10.

Piccinno, Fabiano, Fadri Gottschalk, Stefan Seeger, et Bernd Nowack. 2012. « Industrial Production Quantities and Uses of Ten Engineered Nanomaterials in Europe and the World ». Journal of Nanoparticle Research 14(9): 1109.

Pimentel, David. 2005. « 'Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States' ». Environment, Development and Sustainability 7(2): 229-52.

« Plan Ecophyto : Note de suivi 2018-2019 | Ecophytopic ». https://ecophytopic.fr/reglementation/pour-aller-plus-loin/plan-ecophyto-note-de-suivi-2018-2019 (21 février 2021).

Potter, Kathleen A. et al. 2011. « Central Nervous System Dysfunction in a Mouse Model of Fa2h Deficiency ». Glia 59(7): 1009-21.

Prasad, K. et al. 2007. « Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain ». Environmental Health Perspectives 115(10): 1448-53.

Prasad, Kavita et al. 2009. « Toxicokinetics and Toxicodynamics of Paraquat Accumulation in Mouse Brain ». Experimental Neurology 215(2): 358-67.

Prediger, R.D.S. et al. 2012. « Intranasal administration of neurotoxicants in animals: Support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease ». Neurotoxicity Research 21(1): 90-116.

Prusaczyk, W. Keith, et Gloria J. Fischer. 1983. « A Small-Animal Inhalation Chamber for Short-to-Intermediate Term Exposure ». Behavior Research Methods & Instrumentation 15(3): 369-73.

Pujalté, Igor et al. 2017. « Characterization of Aerosols of Titanium Dioxide Nanoparticles Following Three Generation Methods Using an Optimized Aerosolization System Designed for Experimental Inhalation Studies ». Toxics 5(3). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5634700/ (13 mars 2019).

Qazi, G., et F.A. Dar. 2020. « Nano-agrochemicals: economic potential and future trends ». Nanobiotechnology in Agriculture: an Approach towards Sustainability: 185-93.

Qu, Ruijuan et al. 2014. « Metal Accumulation and Antioxidant Defenses in the Freshwater Fish Carassius Auratus in Response to Single and Combined Exposure to Cadmium and Hydroxylated Multi-Walled Carbon Nanotubes ». Journal of Hazardous Materials 275: 89-98.

Quandt Sara A et al. 2004. « Agricultural and residential pesticides in wipe samples from farmworker family residences in North Carolina and Virginia. » Environmental Health Perspectives 112(3): 382-87.

Rafieepour, Athena et al. 2019. « The Effect of Single and Combined Exposures to Magnetite and Polymorphous Silicon Dioxide Nanoparticles on the Human A 549 Cell Line: In Vitro Study ». Environmental science and pollution research international 26(31).

Raliya, Ramesh et al. 2015. « Mechanistic Evaluation of Translocation and Physiological Impact of Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles on the Tomato (Solanum Lycopersicum L.) Plant ». Metallomics 7(12): 1584-94.

Ransohoff, R.M. 2016. « How neuroinflammation contributes to neurodegeneration ». Science 353(6301): 777-83.

Rapport senatorial, annexe 45 « La qualité de l'eau et assainissement en France (annexes) ». https://www.senat.fr/rap/l02-215-2/l02-215-239.html (21 février 2021).

Rasco, J. F., et R. D. Hood. 1995. « Maternal Restraint Stress-Enhanced Teratogenicity of All-Trans-Retinoic Acid in CD-1 Mice ». Teratology 51(2): 57-62.

Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. 2011. 275 OJ L (COM) http://data.europa.eu/eli/reco/2011/696/oj/fra (22 février 2021).

Reimand, Jüri et al. 2019. « Pathway Enrichment Analysis and Visualization of Omics Data Using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap ». Nature Protocols 14(2): 482-517.

« Reregistration Eligibility Decision PARAQUAT DICHLORIDE 1997 ». https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/20000KXF.PDF?Dockey=20000KXF.PDF.

Richard G. Ames Ph.D., M.P.H., Robert A. Howd, et Laura Doherty. 1993. « Community Exposure to a Paraquat Drift ». Archives of Environmental Health: An International Journal 48(1): 47-52.

Richard, Sabine et al. 2020. « A Pivotal Genetic Program Controlled by Thyroid Hormone during the Maturation of GABAergic Neurons ». iScience 23(3): 100899.

Richardson, J.R. et al. 2005. « Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone ». Toxicological Sciences 88(1): 193-201.

Richmond, Jon. 2000. « The 3Rs - Past, Present and Future ». Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 27: 84-92.

R'mili, B. et al. 2013. « Particle Sampling by TEM Grid Filtration ». Aerosol Science and Technology 47(7): 767-75.

« R-Nano.fr ». Bilan 2019 : https://www.r-nano.fr/ (22 février 2021).

Rocha, Emily M., Briana De Miranda, et Laurie H. Sanders. 2018. « Alpha-Synuclein: Pathology, Mitochondrial Dysfunction and Neuroinflammation in Parkinson's Disease ». Neurobiology of Disease 109: 249-57.

Roduner, Emil. 2006. « Size Matters: Why Nanomaterials Are Different ». Chemical Society Reviews 35(7): 583-92.

Rosenfeldt, Ricki R. et al. 2015. « Nanosized Titanium Dioxide Reduces Copper Toxicity—The Role of Organic Material and the Crystalline Phase ». Environmental Science & Technology 49(3): 1815-22.

Rosenfeldt, Ricki R., Frank Seitz, Ralf Schulz, et Mirco Bundschuh. 2014. « Heavy Metal Uptake and Toxicity in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles: A Factorial Approach Using Daphnia magna. » Environmental Science & Technology 48(12): 6965-72.

Rostène, William et al. 2011. « Neurochemokines: A Menage a Trois Providing New Insights on the Functions of Chemokines in the Central Nervous System ». Journal of Neurochemistry 118(5): 680-94.

Royland, Joyce E., Jinfang Wu, Nasser H. Zawia, et Prasada Rao S. Kodavanti. 2008. « Gene Expression Profiles in the Cerebellum and Hippocampus Following Exposure to a Neurotoxicant, Aroclor 1254: Developmental Effects ». Toxicology and Applied Pharmacology 231(2): 165-78.

Rubin, Bruce K., et James B. Fink. 2003. « The Delivery of Inhaled Medication to the Young Child ». Pediatric Clinics 50(3): 717-31.

Sachana, Magda, et Alan J. Hargreaves. 2018. « Chapter 9 - Toxicological Testing: In Vivo and In Vitro Models ». In Veterinary Toxicology (Third Edition), éd. Ramesh C. Gupta. Academic Press, 145-61. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012811410000009X (23 avril 2021).

Salama, A.K., N.M. Bakry, et M.B. Abou-Donia. 1993. « A review article on placental transfer of pesticides ». International Journal of Occupational Medicine and Toxicology 2(4): 383-97.

Sánchez-Santed, Fernando, Maria Teresa Colomina, et Elena Herrero Hernández. 2016. « Organophosphate Pesticide Exposure and Neurodegeneration ». Cortex 74: 417-26.

Sandrine Millour, Yacine Nia. 2015. « Determination of Ti from TiO2 Nanoparticles in Biological Materials by Different ICP-MS Instruments: Method Validation and Applications ». Journal of Nanomedicine & Nanotechnology 06(02).

Sanhueza, Felipe et al. 2019. « Effect of Ultrasonic Sonication Time on the Structural, Optical and Antibacterial Properties of Ceria Nanostructures ». Materials Research Express 6(9): 095055.

Santhoshkumar, Thirunavukkarasu et al. 2014. « Green Synthesis of Titanium Dioxide Nanoparticles Using Psidium Guajava Extract and Its Antibacterial and Antioxidant Properties ». Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 7(12): 968-76.

Sartori, Fabio, et Edgar Vidrio. 2018. « Environmental fate and ecotoxicology of paraquat: a California perspective ». Toxicological & Environmental Chemistry 100(5-7): 479-517.

Schmoll, Linda, Sherrie Elzey, Vicki Grassian, et Patrick O'Shaughnessy. 2009. « Nanoparticle aerosol generation methods from bulk powders for inhalation exposure studies ». Nanotoxicology 3: 265-75.

Schulz, Holger, et Hartwig Muhle. 2000. « Chapter 16 - Respiration ». In The Laboratory Rat, Handbook of Experimental Animals, éd. Georg J Krinke. London: Academic Press, 323-44. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124264007500558 (22 février 2021).

Schulz-Schaeffer, Walter J. 2010. « The Synaptic Pathology of α-Synuclein Aggregation in Dementia with Lewy Bodies, Parkinson's Disease and Parkinson's Disease Dementia ». Acta Neuropathologica 120(2): 131-43.

Schummer, Claude et al. 2010. « Gas/Particle Partitioning of Currently Used Pesticides in the Atmosphere of Strasbourg (France) ». Air Quality, Atmosphere & Health 3(3): 171-81.

Seiber, J. N., et J. E. Woodrow. 1981. « Sampling and Analysis of Airborne Residues of Paraquat in Treated Cotton Field Environments ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology 10(2): 133-49.

Semmler, M. et al. 2004. « Long-Term Clearance Kinetics of Inhaled Ultrafine Insoluble Iridium Particles from the Rat Lung, Including Transient Translocation into Secondary Organs ». Inhalation Toxicology 16(6-7): 453-59.

Semmler-Behnke, Manuela et al. 2008. « Biodistribution of 1.4- and 18-Nm Gold Particles in Rats ». Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany) 4(12): 2108-11.

Sharma, Hari Shanker et al. 2020. « Chapter One - Pathophysiology of Blood-Brain Barrier in Brain Tumor. Novel Therapeutic Advances Using Nanomedicine ». In International Review of Neurobiology, Novel Therapeutic Advances in Glioblastoma, éd. Igor Bryukhovetskiy, Aruna Sharma, Zhiqiang Zhang, et Hari Shanker Sharma. Academic Press, 1-66. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074774220300222 (14 janvier 2021).

Shepherd, K. Raviie et al. 2006. « The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice ». Pharmacology Biochemistry and Behavior 83(3): 349-59.

Sheppard, DB. 1981b. « Sheppard DB (1981b) Paraquat thirteen week (dietary administration) toxicity in beagles. Report no. CTL/C/1027. Lab: Hazelton Laboratories Europe Ltd., Harrogate, England. Sponsor: ICI, CTL, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, England. Unpublished. »

Shi, Hongbo, Ruth Magaye, Vincent Castranova, et Jinshun Zhao. 2013. « Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data ». Particle and Fibre Toxicology 10: 15.

Shimizu, K. et al. 2001. « Carrier-Mediated Processes in Blood–Brain Barrier Penetration and Neural Uptake of Paraquat ». Brain Research 906(1): 135-42.

Shimizu, M. et al. 2009. « Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse ». Particle and Fibre Toxicology 6.

Shoji, Mikio et al. 2000. « Accumulation of NACP/α-Synuclein in Lewy Body Disease and Multiple System Atrophy ». Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 68(5): 605-8.

Silver, S. D. 1946. « Constant Flow Gassing Chambers: Principles Influencing Design and Operation ». The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 31(10): 1153-61.

Simonin, Marie et al. 2016. « Titanium Dioxide Nanoparticles Strongly Impact Soil Microbial Function by Affecting Archaeal Nitrifiers ». Scientific Reports 6(1): 33643.

Singh, Baljinder, et Kashmir Singh. 2016. « Microbial degradation of herbicides ». Critical Reviews in Microbiology 42(2): 245-61.

Song, M.-R. et al. 2012. « Dispersible silica nanoparticles as carrier for enhanced bioactivity of chlorfenapyr ». Journal of Pesticide Science 37(3): 258-60.

Song, Shili et al. 2009. « Stability of Triazophos in Self-Nanoemulsifying Pesticide Delivery System ». Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 350(1): 57-62.

Songin, Martyna et al. 2011. « Glycogen synthase kinase 3β and its phosphorylated form (Y216) in the paraquat-induced model of parkinsonism ». Neurotoxicity research 19(1): 162-71.

Soto-Alvaredo, J et al. 2014. « Evaluation of the biological effect of Ti generated debris from metal implants: ions and nanoparticles ». Metallomics 6(9): 1702-8.

Soutiere, Shawn E., Clarke G. Tankersley, et Wayne Mitzner. 2004. « Differences in Alveolar Size in Inbred Mouse Strains ». Respiratory Physiology & Neurobiology 140(3): 283-91.

Stapleton, P. A., C. R. McBride, J. Yi, et T. R. Nurkiewicz. 2015. « Uterine microvascular sensitivity to nanomaterial inhalation: An in vivo assessment ». Toxicology and Applied Pharmacology 288(3): 420-28.

Stone, K. C. et al. 1992. « Allometric Relationships of Cell Numbers and Size in the Mammalian Lung ». American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 6(2): 235-43.

Stone, V. et al. 2017. « Nanomaterials versus ambient ultrafine particles: An opportunity to exchange toxicology knowledge ». Environmental Health Perspectives 125(10).

Strickland, Jenna D. et al. 2016. « In Vitro Screening of Silver Nanoparticles and Ionic Silver Using Neural Networks Yields Differential Effects on Spontaneous Activity and Pharmacological Responses ». Toxicology 355-356: 1-8.

Subramanian, Aravind et al. 2005. « Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles ». Proceedings of the National Academy of Sciences 102(43): 15545-50.

Sun, Tian Yin, Fadri Gottschalk, Konrad Hungerbühler, et Bernd Nowack. 2014. « Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials ». Environmental Pollution 185: 69-76.

Sun, Yan et al. 2019. « Nano-Pesticides: A Great Challenge for Biodiversity? » Nano Today 28: 100757.

Sung, Jae Hyuck et al. 2011. « Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles ». Particle and Fibre Toxicology 8: 16.

Sutradhar, Brajendra C. 1996. « Score Test versus Bartlett Type Modified Test for Testing Homogeneity of Variances with Autocorrelated Errors ». Sankhyā: The Indian Journal of Statistics, Series B (1960-2002) 58(1): 10-27.

Takahashi, S., et O. Matsuoka. 1981. « Cross Placental Transfer of 198Au-Colloid in near Term Rats ». Journal of Radiation Research 22(2): 242-49.

Takahashi, Yuta et al. 2010. « Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice ». The Journal of Toxicological Sciences 35(5): 749-56.

Talbot, A. R., C. C. Fu, et M. F. Hsieh. 1988. « Paraquat Intoxication during Pregnancy: A Report of 9 Cases ». Veterinary and Human Toxicology 30(1): 12-17.

Tamayo, Pablo, George Steinhardt, Arthur Liberzon, et Jill P. Mesirov. 2012. « The Limitations of Simple Gene Set Enrichment Analysis Assuming Gene Independence ». Journal of Biomedical Informatics 45(2): 372-87.

Tan, Cheng, et Wen-Xiong Wang. 2014. « Modification of Metal Bioaccumulation and Toxicity in Daphnia Magna by Titanium Dioxide Nanoparticles ». Environmental Pollution 186: 36-42.

Tan, Ling-Yan et al. 2017. « Aggregation Reverses the Carrier Effects of TiO2 Nanoparticles on Cadmium Accumulation in the Waterflea Daphnia magna ». Environmental Science & Technology 51(2): 932-39.

Tankersley, C. G., R. S. Fitzgerald, et S. R. Kleeberger. 1994. « Differential control of ventilation among inbred strains of mice ». American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 267(5): R1371-77.

Tann, R. Scott. 1999. Pesticide Formulations and Application Systems: Global Pest Control Formulations for the Next Millennium : Nineteenth Volume. ASTM International.

Tanner Caroline M. et al. 2011. « Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease ». Environmental Health Perspectives 119(6): 866-72.

Tao, Xianji et al. 2013. « Effects of Aqueous Stable Fullerene Nanocrystal (NC60) on Copper (Trace Necessary Nutrient Metal): Enhanced Toxicity and Accumulation of Copper in Daphnia Magna ». Chemosphere 92(9): 1245-52.

Taurozzi, Julian S., Vincent A. Hackley, et Mark R. Wiesner. 2011. « Ultrasonic Dispersion of Nanoparticles for Environmental, Health and Safety Assessment – Issues and Recommendations ». Nanotoxicology 5(4): 711-29.

Teleanu, Daniel Mihai, Cristina Chircov, Alexandru Mihai Grumezescu, et Raluca Ioana Teleanu. 2019. « Neurotoxicity of Nanomaterials: An Up-to-Date Overview ». Nanomaterials 9(1): 96.

Thany, Steeve H., Pascal Reynier, et Guy Lenaers. 2013. « Neurotoxicité des pesticides: Quel impact sur les maladies neurodégénératives ? » médecine/sciences 29(3): 273-78.

« The Measure Of Man - Wellcome Sanger Institute ». https://www.sanger.ac.uk/news_item/2002-12-05-the-measure-of-man/ (3 mars 2021). Dec 2002, Press Office 5.

Thiruchelvam, M. et al. 2000. « Potentiated and Preferential Effects of Combined Paraquat and Maneb on Nigrostriatal Dopamine Systems: Environmental Risk Factors for Parkinson's Disease? » Brain Research 873(2): 225-34.

Thompson, JD. 1985. « Thompson JD, Cushman JR & Wong ZA (1985) Modified Buehler test for the skin sensitisation potential of paraquat 3 concentrate (SX-1465). Study no: SOCAL 2355, Lab: Chevron Environmental Health Centre, Richmond, CA USA, Sponsor: Chevron Chemical Co. Richmond CA USA. Unpublished. »

Tomita, Masafumi et al. 2007. « Mouse Model of Paraquat-Poisoned Lungs and Its Gene Expression Profile ». Toxicology 231(2): 200-209.

Tong, Yujia et al. 2017. « Polymeric Nanoparticles as a Metolachlor Carrier: Water-Based Formulation for Hydrophobic Pesticides and Absorption by Plants ». Journal of Agricultural and Food Chemistry 65(34): 7371-78.

Torrent, Xavier et al. 2019. « Assessment of spray drift potential reduction for hollow-cone nozzles: Part 1. Classification using indirect methods ». Science of The Total Environment. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719326890 (15 juillet 2019).

Tsatsakis, A. M., K. Perakis, et E. Koumantakis. 1996. « Experience with Acute Paraquat Poisoning in Crete ». Veterinary and human toxicology 38(2): 113-17.

Tuttle, Richard S et al. 2010. « Design, assembly, and validation of a nose-only inhalation exposure system for studies of aerosolized viable influenza H5N1 virus in ferrets ». Virology Journal 7: 135.

Umezawa, M. et al. 2012. « Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information ». Journal of Toxicological Sciences 37(6): 1247-52.

United States Department of Agriculture, National Institute of Food and Agriculture (USDA). 2015. « USDA announces $4.6 Million for Nanotechnology Research ». https://nifa.usda.gov/announcement/usda-announces-46-millionnanotechnology- research (4 juin 2019).

Valverde, Jose Manuel, et Antonio Castellanos. 2007. « Fluidization, Bubbling and Jamming of Nanoparticle Agglomerates ». Chemical Engineering Science 62(23): 6947-56.

Van Dijk, Harrie F. G., et Robert Guicherit. 1999. « Atmospheric Dispersion of Current-Use Pesticides: A Review of the Evidence from Monitoring Studies ». Health Council of the Netherlands, Held in Driebergen, The Netherlands, April 22–24, 1998, Dordrecht: Springer Netherlands, 21-70. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1536-2_3 (5 février 2021).

Vance, Marina E. et al. 2015. « Nanotechnology in the Real World: Redeveloping the Nanomaterial Consumer Products Inventory ». Beilstein Journal of Nanotechnology 6(1): 1769-80.

Vasir, Jaspreet K., et Vinod Labhasetwar. 2007. « Biodegradable Nanoparticles for Cytosolic Delivery of Therapeutics ». Advanced Drug Delivery Reviews 59(8): 718-28.

Villaverde, Juan et al. 2017. « An overview of nanopesticides in the framework of European legislation ». In , 227-71.

Vinegar, A., E. E. Sinnett, et D. E. Leith. 1979. « Dynamic mechanisms determine functional residual capacity in mice, Mus musculus ». Journal of Applied Physiology 46(5): 867-71.

Vitali, Matteo et al. 2009. « Operative Modalities and Exposure to Pesticides During Open Field Treatments Among a Group of Agricultural Subcontractors ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology 57(1): 193-202.

Vohra, Muhammad Shariq, et Keiichi Tanaka. 2003. « Photocatalytic Degradation of Aqueous Pollutants Using Silica-Modified TiO2 ». Water Research 37(16): 3992-96.

Voutsas, Epaminondas, Chrisanthi Vavva, Kostis Magoulas, et Dimitrios Tassios. 2005. « Estimation of the Volatilization of Organic Compounds from Soil Surfaces ». Chemosphere 58(6): 751-58.

Vranic, Sandra et al. 2017. « Impact of Serum as a Dispersion Agent for in Vitro and in Vivo Toxicological Assessments of TiO2 Nanoparticles ». Archives of Toxicology 91(1): 353-63.

Wang, Anthony et al. 2011. « Parkinson's Disease Risk from Ambient Exposure to Pesticides ». European Journal of Epidemiology 26(7): 547-55.

Wang, Chao et al. 2014. « The Effects of Hydroxylated Multiwalled Carbon Nanotubes on the Toxicity of Nickel to Daphnia Magna under Different PH Levels ». Environmental Toxicology and Chemistry 33(11): 2522-28.

Wang, Jiangxue et al. 2008. « Time-Dependent Translocation and Potential Impairment on Central Nervous System by Intranasally Instilled TiO2 Nanoparticles ». Toxicology 254(1): 82-90.

Wang, Jing et al. 2011. « How Can Nanobiotechnology Oversight Advance Science and Industry: Examples from Environmental, Health, and Safety Studies of Nanoparticles (Nano-EHS) ». Journal of Nanoparticle Research 13(4): 1373-87.

Wang, Qiangwei et al. 2014. « Bioconcentration and metabolism of BDE-209 in the presence of titanium dioxide nanoparticles and impact on the thyroid endocrine system and neuronal development in zebrafish larvae ». Nanotoxicology 8(sup1): 196-207.

Wang, Xinghao et al. 2016. « Effect of Different Carbon Nanotubes on Cadmium Toxicity to Daphnia Magna: The Role of Catalyst Impurities and Adsorption Capacity ». Environmental Pollution 208: 732-38.

Wang, Xue-Jing et al. 2020. « Autonomic Ganglionic Injection of α-Synuclein Fibrils as a Model of Pure Autonomic Failure α-Synucleinopathy ». Nature Communications 11(1): 934.

Wang, Yan et al. 2016. « The Application of Nano-TiO2 Photo Semiconductors in Agriculture ». Nanoscale Research Letters 11. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126030/ (7 novembre 2019).

Wang, Yun et al. 2013. « Susceptibility of Young and Adult Rats to the Oral Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles ». Small 9(9-10): 1742-52.

Ward Mary H. et al. 2006. « Proximity to Crops and Residential Exposure to Agricultural Herbicides in Iowa ». Environmental Health Perspectives 114(6): 893-97.

Warheit, D. B., S. C. Brown, et E. M. Donner. 2015. « Acute and Subchronic Oral Toxicity Studies in Rats with Nanoscale and Pigment Grade Titanium Dioxide Particles ». Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association 84: 208-24.

Watanabe, Kenta, Kenji Kondo, Tatsuya Yamasoba, et Kimitaka Kaga. 2007. « Age-Related Change in the Axonal Diameter of the Olfactory Nerve in Mouse Lamina Propria ». Acta Oto-Laryngologica 127(sup559): 108-12.

Weber, Elin M., et I. Anna S. Olsson. 2008. « Maternal Behaviour in Mus Musculus Sp.: An Ethological Review ». Applied Animal Behaviour Science 114(1): 1-22.

Weinstock, Marta. 2005. « The Potential Influence of Maternal Stress Hormones on Development and Mental Health of the Offspring ». Brain, Behavior, and Immunity 19(4): 296-308.

White, Jason C., et Jorge Gardea-Torresdey. 2018. « Achieving Food Security through the Very Small ». Nature Nanotechnology 13(8): 627-29.

Whitley, Sarah K., William T. Horne, et Jay K. Kolls. 2016. « Research Techniques Made Simple: Methodology and Clinical Applications of RNA Sequencing ». Journal of Investigative Dermatology 136(8): e77-82.

Wills, Jonathan et al. 2012. « Paraquat, but Not Maneb, Induces Synucleinopathy and Tauopathy in Striata of Mice through Inhibition of Proteasomal and Autophagic Pathways ». PloS One 7(1): e30745.

Winter-Sorkina, et Flemming Cassee. 2003. « From concentration to dose: factors influencing airborne particulate matter deposition in humans and rats ». Toxicological Sciences.

Wu, Meilin, Clare A. Puddifoot, Palmer Taylor, et William J. Joiner. 2015. « Mechanisms of Inhibition and Potentiation of A4β2 Nicotinic Acetylcholine Receptors by Members of the Ly6 Protein Family ». The Journal of Biological Chemistry 290(40): 24509-18.

X, Gao et al. 2011. « Effects of Developmental Exposure to TiO2 Nanoparticles on Synaptic Plasticity in Hippocampal Dentate Gyrus Area: An in Vivo Study in Anesthetized Rats ». Biological trace element research 143(3). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21331565/ (23 avril 2021).

Xie, Guangping, Chen Wang, Jiao Sun, et Gaoren Zhong. 2011. « Tissue Distribution and Excretion of Intravenously Administered Titanium Dioxide Nanoparticles ». Toxicology Letters 205(1): 55-61.

Yamashita, K. et al. 2011. « Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice ». Nature Nanotechnology 6(5): 321-28.

Yan, Changzhou et al. 2017. « Changes in Arsenate Bioaccumulation, Subcellular Distribution, Depuration, and Toxicity in Artemia Salina Nauplii in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles ». Environmental Science: Nano 4(6): 1365-76.

Yan, Mengling et al. 2017. « Integrated analysis of paraquat-induced microRNAs-mRNAs changes in human neural progenitor cells ». Toxicology in Vitro 44: 196-205.

Yang, Fan et al. 2006. « Influence of Nano-Anatase TiO 2 on the Nitrogen Metabolism of Growing Spinach ». Biological Trace Element Research 110(2): 179-90.

Yang, Feng-Lian, Xue-Gang Li, Fen Zhu, et Chao-Liang Lei. 2009. « Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) ». Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(21): 10156-62.

Yang, Hui et al. 2012. « Effects of Gestational Age and Surface Modification on Materno-Fetal Transfer of Nanoparticles in Murine Pregnancy ». Scientific Reports 2(1): 847.

Yang, Jinhee et al. 2011. « DGKι regulates presynaptic release during mGluR-dependent LTD ». The EMBO Journal 30(1): 165-80.

Yang, Kun, Daohui Lin, et Baoshan Xing. 2009. « Interactions of Humic Acid with Nanosized Inorganic Oxides ». Langmuir 25(6): 3571-76.

Yang, M. S., H. W. Chan, et L. C. Yu. 2006. « Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activities Are Partially Responsible for Determining the Susceptibility of Cells to Oxidative Stress ». Toxicology 226(2): 126-30.

Yang, Wei-Wan, Yan Li, Ai-Jun Miao, et Liu-Yan Yang. 2012. « Cd2+ Toxicity as Affected by Bare TiO2 Nanoparticles and Their Bulk Counterpart ». Ecotoxicology and Environmental Safety 85: 44-51.

Yang, Wei-Wan, Ai-Jun Miao, et Liu-Yan Yang. 2012. « Cd2+ Toxicity to a Green Alga Chlamydomonas Reinhardtii as Influenced by Its Adsorption on TiO2 Engineered Nanoparticles ». PloS One 7(3): e32300.

Yeh, H. C. et al. 1990. « Comparative Evaluation of Nose-Only Versus Whole-Body Inhalation Exposures for Rats—Aerosol Characteristics and Lung Deposition ». Inhalation Toxicology 2(3): 205-21.

Yi, Jinghai et al. 2013a. « Whole-Body Nanoparticle Aerosol Inhalation Exposures ». Journal of Visualized Experiments : JoVE (75). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3679583/ (15 janvier 2020).

Yin, Jilei et al. 2014. « Aerosol inhalation exposure study of respiratory toxicity induced by 20 nm anatase titanium dioxide nanoparticles ». Toxicology Research 3(5): 367-74.

Ze, Y. et al. 2014. « TiO2 nanoparticles induced hippocampal neuroinflammation in mice ». PLoS ONE 9(3).

Zhang, L., Kladi A, et Verykios Xe. 1994. « Spectroscopic Study of the Effects of Carrier Doping on the Surface-Structure of Rh/TiO2 Catalysts and on Their Interaction with Co and H-2 ». Journal of Physical Chemistry 98(27): 6804-11.

Zhang, X., W. Li, et Z. Yang. 2015. « Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update ». Archives of Toxicology 89(12): 2207-17.

Zhang, Yongbin et al. 2011. « Mechanistic Toxicity Evaluation of Uncoated and PEGylated Single-Walled Carbon Nanotubes in Neuronal PC12 Cells ». ACS Nano 5(9): 7020-33.

Zhang, Zhong et al. 2012. « Detection of Engineered Silver Nanoparticle Contamination in Pears ». Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(43): 10762-67.

Zheng, Lei, Fashui Hong, Shipeng Lu, et Chao Liu. 2005. « Effect of Nano-TiO(2) on Strength of Naturally Aged Seeds and Growth of Spinach ». Biological Trace Element Research 104(1): 83-92.

Zhu, Min, Wenwei Li, et Chuanzhen Lu. 2012. « Role of Alpha-Synuclein Protein Levels in Mitochondrial Morphology and Cell Survival in Cell Lines ». PLOS ONE 7(4): e36377.

Zhu, Xiaoshan, Jin Zhou, et Zhonghua Cai. 2011. « TiO2 Nanoparticles in the Marine Environment: Impact on the Toxicity of Tributyltin to Abalone (Haliotis Diversicolor Supertexta) Embryos ». Environmental Science & Technology 45(8): 3753-58.

Ziemińska, Elżbieta, Aleksandra Stafiej, et Lidia Strużyńska. 2014. « The Role of the Glutamatergic NMDA Receptor in Nanosilver-Evoked Neurotoxicity in Primary Cultures of Cerebellar Granule Cells ». Toxicology 315: 38-48.

.