



HAL
open science

Toxicité de nanoparticules, micro-et nanoplastiques, sur des modèles intestinaux en cultures, in vitro

Manon Dussol

► **To cite this version:**

Manon Dussol. Toxicité de nanoparticules, micro-et nanoplastiques, sur des modèles intestinaux en cultures, in vitro. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03626439

HAL Id: dumas-03626439

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03626439>

Submitted on 31 Mar 2022

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.



FACULTÉ DE PHARMACIE
Université Clermont Auvergne

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE PHARMACIE

Année : 2021

N°

THÈSE D'EXERCICE
Pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 23 septembre 2021

par

Manon DUSSOL

Toxicité de nanoparticules, micro- et nanoplastiques, sur des modèles intestinaux en cultures, in vitro

Directeurs de thèse : **Mme Marie CARRIERE**

Mme Marie-Ange CIVIALE

Jury :

Président : **Mme Marie-Ange CIVIALE** Maître de conférences HDR,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres : **Mme Marie CARRIERE** Chercheur Senior au CEA Grenoble,
HDR à l'EDCSV Grenoble

Mme Valérie SAUTOU Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Mme Mercedes QUINTANA Maître de conférences,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand



UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE PHARMACIE

Année : 2021

N°

THÈSE D'EXERCICE
Pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 23 septembre 2021

par

Manon DUSSOL

**Toxicité de nanoparticules, micro- et nanoplastiques, sur des
modèles intestinaux en cultures, in vitro**

Directeurs de thèse : **Mme Marie CARRIERE**

Mme Marie-Ange CIVIALE

Jury :

Président : **Mme Marie-Ange CIVIALE** Maître de conférences HDR,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres : **Mme Marie CARRIERE** Chercheur Senior au CEA Grenoble,
HDR à l'EDCSV Grenoble

Mme Valérie SAUTOU Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Mme Mercedes QUINTANA Maître de conférences,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de ce jury de thèse, c'est un honneur et un plaisir de vous compter parmi ce jury.

Madame Civiale Marie-Ange, merci de m'avoir encouragée et motivée pour soutenir cette thèse et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

Madame Sautou Valérie, merci de vous intéresser à mon travail de recherche et merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury,

Madame Quintana Mercedes, merci à toi d'avoir accepté cette participation, tu m'as initié au vaste monde des nanoparticules. Faire mon stage de 5^{ème} année à tes côtés m'a confirmé mon envie de poursuivre en recherche.

Enfin, Madame Carrière Marie, merci de m'avoir fait confiance dès le début et d'avoir accepté de diriger cette thèse, pour ta patience, ton aide et ta bienveillance. Je te l'ai répété plusieurs fois, mais encore merci pour tout ce que tu m'as apporté.

Merci à David Béal pour m'avoir formé et appris tant de choses sur la culture cellulaire, ainsi qu'à Fanny Dussert pour sa patience et pour avoir pris le temps de répondre à tant de questions. Merci aussi à toute l'équipe du CIBEST du CEA de Grenoble pour leur accueil et l'ambiance chaleureuse qui régnait tous les jours dans les couloirs du C5 et pour avoir fait en sorte que tous les matins, je me lève avec le sourire pour aller travailler.

Merci aux personnes qui m'ont aidée et soutenue pendant la rédaction de cette thèse. Merci aux membres de ma famille qui ont été présents, chacun à leur façon mais qui étaient tous indispensables. Merci à mes amis d'être ce qu'ils sont. Ces années d'études de pharmacie m'ont fait rencontrer des gens qui resteront des amis pour encore longtemps.

Et enfin, merci à Léon, qui sait (presque) toujours quoi dire et quoi faire au moment où il le faut. « Ça suffit, tu t'arrêtes de travailler » parce que c'est tout aussi important. Pour son humour, pour toutes ses attentions, pour le regard plein d'amour qu'il me porte et, surtout, pour tout le reste.

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	10
1.1. LE PLASTIQUE : ETAT DES LIEUX.....	10
1.2. LA BARRIERE INTESTINALE HUMAINE	13
1.3. MALADIE DE CROHN	14
1.4. MODELES D'EPITHELIUM INTESTINAL	15
1.4.1. Cellules	15
1.4.1. Modèles en coculture en 2 dimensions d'épithélium intestinal humain	16
1.5. NANOPLASTIQUES DE POLYSTYRENE.....	17
1.6. OBJECTIFS DE L'ETUDE	17
2. MATERIELS ET METHODES	19
2.1. PARTICULES.....	19
2.2. CULTURE CELLULAIRE ET EXPOSITION	19
2.2.1. Décongélation.....	19
2.2.2. Maintien des cellules.....	20
2.3. EXPOSITION AUX NANOPARTICULES DE POLYSTYRENE	22
2.3.1. Exposition aigue.....	22
2.3.2. Exposition chronique.....	22
2.4. TEST DE VIABILITE CELLULAIRE	22
2.5. QUANTIFICATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS)	24
2.6. TEST DE GENOTOXICITE	26
2.7. INFLAMMATION.....	28
2.8. ANALYSES STATISTIQUES.....	30
3. RESULTATS.....	31
3.1. VALIDATION DU MODELE D'EPITHELIUM INTESTINAL MUTE 1007FS	31
3.2. CYTOTOXICITE	32
3.2.1. Cytotoxicité sur cocultures non différenciées.....	33
3.2.2. Cytotoxicité sur coculture différenciée 17 jours	36
3.3. STRESS OXYDANT	38
3.4. GENOTOXICITE	41
3.4.1. Coculture non différenciée, exposition aigue.....	41
3.4.2. Génotoxicité sur coculture différenciée 17 jours, exposition aigue et chronique.....	42
3.5. INFLAMMATION.....	42
3.5.1. ELISA IL-8 sur coculture non différenciée, exposition aigue	43
3.5.2. ELISA IL-8 sur coculture différenciée	44
4. DISCUSSION	47
4.1. TESTS DES PS-COOH SUR COCULTURES D'EPITHELIUM INTESTINAL HUMAIN MUTE ET NON MUTE.....	47
4.1.1. Cytotoxicité	47
4.1.2. Stress oxydant.....	48
4.1.3. Génotoxicité.....	48
4.1.4. Inflammation	49
4.2. TESTS DES PS-NH2 SUR COCULTURES D'EPITHELIUM INTESTINAL HUMAIN MUTE ET NON MUTE	49
4.2.1. Cytotoxicité	49
4.2.2. Stress oxydant.....	50
4.2.3. Génotoxicité.....	51
4.2.4. Inflammation	51
4.3. DIFFERENCES ENTRE PS-COOH ET PS-NH ₂	52
4.4. ANALYSE CRITIQUE ET PERSPECTIVES	53
4.4.1. Alternative aux cultures en 2 dimensions : les organoïdes	53

4.4.2.	<i>Exposition aux nanoparticules et maladie de Crohn</i>	55
5.	CONCLUSION	56
6.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57
7.	ANNEXES	62

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'épithélium intestinal	14
Figure 2 : Coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX (90%-10%) 24h après l'ensemencement.	20
Figure 3 : Coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX (90% - 10%) différenciées 17 jours.	21
Figure 4 : Schéma explicatif du test WST-1.	23
Figure 5 : Réaction chimique au sein de la mitochondrie transformant la DHR123 en Rhodamine, composé fluorescent, en présence de ROS.	25
Figure 6 : Test des comètes sur coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX.....	26
Figure 7 : Principe du test des comètes. (37)	27
Figure 8 : Principe du test ELISA.	29
Figure 9 : Quantification des IL-8 par un test ELISA dans le surnageant des cellules ayant été exposées à du MDP (0µg/mL ; 1µg/mL ; 2µg/mL ou 5µg/mL) et du LPS (0µg/mL ou 10µg/mL).	32
Figure 10 : Essais de cytotoxicité sur coculture non différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX. ..	34
Figure 11 : Essais de cytotoxicité sur coculture non différenciée de Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX.	34
Figure 12 : Essais de cytotoxicité sur monoculture de cellules HT29-MTX.	35
Figure 13 : Essais de cytotoxicité des PS-NH ₂ sur coculture non différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX.	36
Figure 14 : Essais de cytotoxicité aigue des PS-NH ₂ sur coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX différenciées 17 jours.	37
Figure 15 : Essais de cytotoxicité répétée des PS-NH ₂ sur coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX différenciées 17 jours.	38
Figure 16 : Test DHR123 sur les cellules non différenciées en coculture Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX exposées aux PS-COOH et PS-NH ₂	39
Figure 17 : Test DHR123 sur les cellules non différenciées en coculture Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX exposées aux PS-COOH et PS-NH ₂	40
Figure 18 : Test des comètes réalisé sur coculture non différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX, après exposition à des PS-COOH et PS-NH ₂	42
Figure 19 : Quantification des IL-8 par le test ELISA dans le surnageant des cellules en cocultures non différenciées exposées 24h aux PS-COOH et PS-NH ₂	44
Figure 20 : Quantification des IL-8 par le test ELISA dans le surnageant des cellules en cocultures différenciées 17 jours, exposées 24h aux PS-COOH et PS-NH ₂	45

Figure 21 : Quantification des IL-8 par le test ELISA dans le surnageant des cellules en cocultures différenciées
17 jours, exposées 4 jours aux PS-COOH et PS-NH₂..... 45

Figure 22 : Récapitulatif des tests réalisés dans cette étude. 47

Liste des annexes

Annexe 1 : Essais de cytotoxicité sur coculture différenciées 17 jours Caco2-WT/HT29-MTX et Caco2-1007fs/HT29-MTX ; exposition aiguë aux PS-COOH 500 nm et 50 nm.	62
Annexe 2 : Essais de cytotoxicité sur coculture différenciées 17 jours Caco2-WT/HT29-MTX et Caco2-1007fs/HT29-MTX ; exposition répétée aux PS-COOH 500 nm et 50 nm.	63
Annexe 3 : Test DHR123 sur les cellules en coculture Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX exposées aux PS-COOH.	64
Annexe 4 : Test DHR123 sur les cellules en coculture Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX exposées aux PS-COOH.	65
Annexe 5 : Test d'interférence des PS avec le milieu de culture, dans des plaques sans cellule.	66
Annexe 6 : Test d'interférence des PS dans du milieu de culture, avec 10% de DHR123, dans des plaques sans cellule.	67
Annexe 7 : Test des comètes réalisé sur coculture différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX, après exposition aiguë à des PS-COOH de 50 nm et 500 nm aux concentrations 25 µg/mL et 50 µg/mL et des PS-NH ₂ de 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL et 6,25 µg/mL.	68
Annexe 8 : Test des comètes réalisé sur coculture différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 ^{1007fs} / HT29-MTX, après expositions répétées à des PS-COOH de 50 nm et 500 nm aux concentrations 25 µg/mL et 50 µg/mL et des PS-NH ₂ de 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL et 6,25 µg/mL.	69

Table des abréviations

ADN : Acides désoxyribonucléiques

CARD15 : Caspase recruitment domain-containing protein 15

DHR 123 : Dihydrorhodamine 123

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IgA : Immunoglobuline A

LV : Lentivirus

MMS : Méthyl Méthanesulfonate

MP : Micro-plastique

NaCl : Chlorure de sodium

NOD2 : Nucleotide-binding oligomerization domain 2

NP : Nano-plastique

NP-PS : Nanoparticules de polystyrène

PBS : Tampon phosphate salin

PET : Polytéraphthalate d'éthylène

POP : Polluants organiques persistants

PP : Polypropylène

PS : Polystyrène

PS-COOH : Nanoparticules de polystyrène fonctionnalisées par des groupements carboxyle

PS-NH₂ : Nanoparticules de polystyrène fonctionnalisées par des groupements amine

PUR : Polyuréthane

PVC : Polychlorure de vinyle

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SCGE : Electrophorèse sur gel monocellulaire

SVF : Sérum de veau fœtal

TA : Cellules amplificatrices de transit

WST-1 : 4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzènedisulfonate

WT : Wildtype

1. Introduction

1.1. Le plastique : état des lieux

Le plastique, ou matière plastique, est un polymère formé par l'assemblage de macromolécules constituées de longues chaînes carbonées, auquel est ajouté un ou des additifs et/ou adjuvants pour améliorer les propriétés du matériau. Les propriétés de ces polymères sont directement dues à leurs structures macromoléculaires. Il existe deux catégories de plastiques : les thermoplastiques et les plastiques thermodurcissables. Les thermoplastiques peuvent être fondus pour leur donner la forme voulue puis ils durcissent en refroidissant. Cette caractéristique est réversible ce qui en fait un matériau recyclable. Il existe une large gamme de thermoplastiques tels que le polypropylène (PP), polychlorure de vinyle (PVC), polytéréphtalate d'éthylène (PET) ou encore le polystyrène (PS) qui sont parmi les plastiques les plus produits dans le monde. Les plastiques thermodurcissables vont, eux, subir des changements chimiques irréversibles lorsqu'ils sont chauffés, ne leur permettant pas d'être renouvelables. Le silicone, la résine époxy ou le polyuréthane (PUR) sont des exemples de plastiques thermodurcissables (1). Les plastiques servent en très grande majorité pour les emballages ou encore la construction et le bâtiment. Cependant, tous les secteurs sont concernés comme l'agriculture ou le secteur médical (1).

La production mondiale de plastique continue d'augmenter au cours des années. En effet, en 2019, environ 368 millions de tonnes de plastique ont été produites dans le monde alors qu'elle était de 1,5 millions de tonnes en 1950 (1,2). Entre 2017 et 2018 une hausse de 3% de la production de plastique à travers le monde a été enregistrée. En revanche, la pandémie due à la COVID-19 a fortement impacté l'année 2020 en entraînant une diminution de la production mondiale de plastique (1). Cependant, la courbe repart à la hausse depuis le deuxième semestre 2020.

La constante augmentation de la production de plastique a mis en évidence la problématique de la gestion des déchets. Aucun des plastiques couramment utilisés n'est biodégradable ce qui favorise une accumulation des déchets dans les décharges ou l'environnement. Le seul moyen d'éliminer les déchets plastiques est un traitement thermique destructeur comme la combustion ou la pyrolyse. Barnes et al. estimaient que les matières plastiques représentaient 10% du total

des déchets produits (3). Entre 1950 et 2015, sur les déchets plastiques cumulés qui ont été générés dans le monde, environ 9% ont été recyclés, 12% ont été incinérés et 79% ont été accumulés dans des décharges ou dans le milieu naturel (4).

Aujourd'hui, les débris plastiques sont retrouvés de manière ubiquitaire, en impactant les écosystèmes tout comme la faune. Les océans sont les écosystèmes les plus affectés par les déchets plastiques. En effet, plusieurs études ont tenté d'estimer la présence de plastique dans les océans, notamment Cózar et al. qui évaluent la quantité globale de plastique à la surface des océans entre 7000 et 35000 tonnes (5). Cependant, ces chiffres sont probablement sous-estimés. Les calculs réalisés par Jambeck et al. estiment la quantité de plastique entrant dans les océans pendant l'année 2010 de 4,8 à 12,7 millions de tonnes et ce chiffre pourrait être augmenté d'un facteur dix en 2025 en l'absence d'amélioration de la gestion des déchets (6). De plus, la contamination des écosystèmes terrestres et des systèmes d'eau douce est de plus en plus signalée quelle que soit la région du monde étudiée (7).

Les voies de décomposition des plastiques dans l'environnement sont multiples. La dégradation d'objets plastiques macroscopiques en microplastiques (< 5 mm) se produit généralement par une combinaison de processus chimiques et physiques qui peuvent notamment impliquer la photodégradation, l'oxydation, la dégradation hydrolytique et la désintégration mécanique (8). Du fait de leur dégradation, les plastiques peuvent atteindre des dimensions nanométriques (2). Bien qu'il n'existe pas de classification stricte des plastiques en fonction de leur taille, les microplastiques (MP) sont généralement définis comme ayant une taille inférieure à 5 mm et les nanoplastiques (NP) comme ayant une taille inférieure à 1000 nm (9). Ces microplastiques et nanoplastiques issus de la fragmentation d'objets en plastique plus gros sont définis comme étant des micro-, nano-plastiques secondaires. Néanmoins, des microparticules et nanoparticules de plastiques sont également fabriquées (micro- et nano-plastiques primaires) à des fins industrielles, par exemple pour une utilisation dans des peintures, des adhésifs, pour l'électronique ou encore dans les cosmétiques et peuvent donc être libérés directement dans l'environnement (2,10).

Aujourd'hui, les micro- et nanoplastiques sont omniprésents dans l'environnement, où ils sont retrouvés dans l'air, l'eau, les sédiments et dans les organismes terrestres et aquatiques (11). L'exposition de l'homme aux particules de plastique peut se faire par ingestion, par inhalation ou via la voie cutanée, l'ingestion étant la voie majoritaire (12,13).

Les risques pour les espèces marines sont nombreux du fait de l'importante contamination des eaux, de la faible dégradabilité et de la longue durée de vie des plastiques. Il a été démontré que les particules de plastique ingérées par les espèces marines, intègrent la chaîne alimentaire marine par transfert trophique et s'y accumulent par le phénomène de bioaccumulation. La population humaine peut se retrouver à son tour contaminée via l'alimentation. Un rapport de l'EFSA indique que des microplastiques sont retrouvés dans environ un tiers de tous les poissons testés et capturés dans le gyre central du pacifique nord (10). Danopoulos et al. estiment que la quantité moyenne de microplastique retrouvée dans les produits issus de la mer et destinés à la consommation est de 0-2,9 MP / gramme de poisson, 0,1-8,6 MP / gramme de crustacés et de 0-10,5 MP / gramme de mollusques. Cela conduirait, pour la population humaine, à une absorption pouvant atteindre 53 864 particules par an (14). En plus d'avoir été détectés dans les fruits de mer, des microplastiques ont également été détectés dans le sel, l'eau de bouteille, la bière et le lait (7,11). Danopoulos et al. estiment que la consommation d'eau de bouteille entraînerait l'ingestion de $>3,5 \times 10^6$ microparticules de plastique par personne et par an en Europe, majoritairement des PET et PP (15). Ce qui représente une quantité environ 7 fois supérieure par rapport à la consommation d'eau du robinet. Cela conduit à une exposition importante du tractus gastro-intestinal humain, ce qui a été prouvé par la détection de particules de plastiques dans les selles de volontaires humains (16). Les effets d'une telle exposition sont inconnus sur la santé.

Alors que l'interdiction de certains produits plastiques à usage unique est entrée en vigueur au 1^{er} janvier 2020 en France, il n'y a actuellement pas de législation pour encadrer les micro- et nano-plastiques dans les aliments et l'eau potable, en particulier parce que les données de toxicité des micro- mais surtout des nano-plastiques font encore défaut. En effet, à ce jour, les connaissances sur l'exposition humaine et les répercussions sur la santé sont très limitées (4). Les effets toxicologiques de l'ingestion de microplastiques et de nanoplastiques sur l'Homme ne sont toujours pas connus (10,11).

Du point de vue biologique, les nanoplastiques dont la taille est inférieure à 150 nm représentent la fraction la plus pertinente à étudier car ils peuvent traverser le tractus gastro-intestinal (17,18) et ainsi atteindre la circulation systémique et les organes cibles (19). Bien que la mesure de l'exposition humaine soit complexe en raison de l'hétérogénéité de la taille des particules, une estimation a été rapportée par Senatirajah et al, concluant qu'environ 0,1 à 5 g de MP (0 à 1

mm) sont ingérés chaque semaine, soit 0,01 à 0,71 MP par jour chez un humain adulte (20). L'impact sanitaire d'une telle ingestion chronique est encore peu documentée, même si un effort important est actuellement consacré à son évaluation.

1.2. La barrière intestinale humaine

La barrière intestinale, aussi appelée barrière muqueuse intestinale, permet une séparation entre le milieu interne et le lumen, apportant une protection du milieu interne et une sélection des éléments traversant cette barrière tout en préservant la capacité d'absorber les nutriments. Cette séparation est aussi bien physique, biochimique que de nature immunitaire (21). En effet, elle se compose d'un épithélium qui sépare physiquement la lumière intestinale du milieu interne et qui est en charge du transport des substances. Cet épithélium est constitué de différents types cellulaires disposés en monocouche : les entérocytes qui ont un rôle absorbant, les cellules caliciformes productrices de mucus, les cellules de Paneth productrices de peptides antimicrobiens et les cellules entéro-endocrines productrices d'hormones. L'épithélium forme des villosités au fond desquelles se trouvent les cryptes intestinales qui contiennent les cellules souches intestinales (Figure 1). Du côté extra épithélial, la sécrétion de mucines, de peptides antimicrobiens et d'Immunoglobuline A (IgA) sécrétoires renforcent et protègent la barrière intestinale. Du côté intra épithélial, la lamina propria se compose de cellules dendritiques, de macrophages, de cellules lymphoïdes innées, de lymphocytes T et de plasmocytes. Toutes ces cellules ont pour rôle de médier la réponse immunitaire locale innée et adaptative (22).

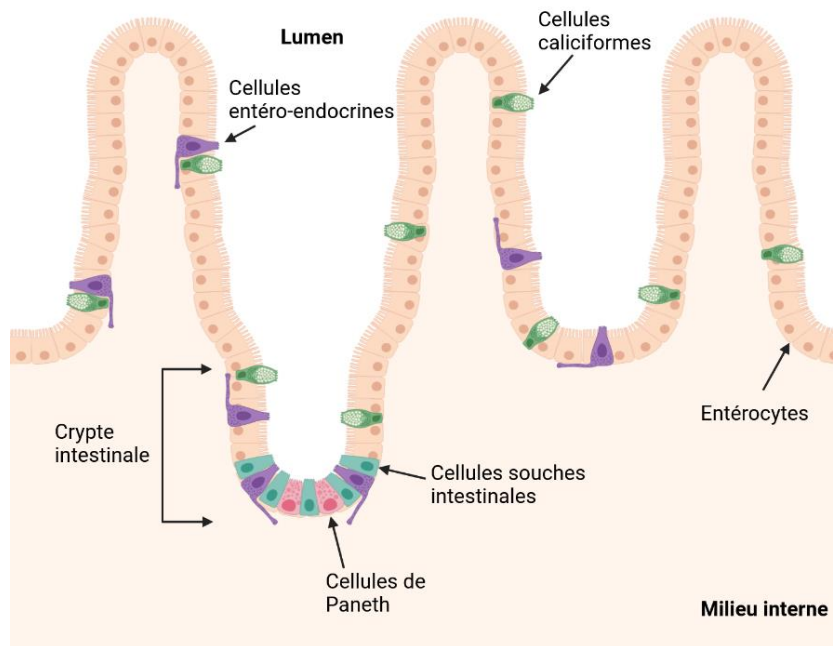


Figure 1 : Schéma de l'épithélium intestinal

1.3. Maladie de Crohn

Cette étude s'inscrit dans un plus vaste projet visant à déterminer si les personnes atteintes de la maladie de Crohn seraient plus sensibles à l'exposition aux nanoplastiques.

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'appareil digestif résultant de l'interaction de facteurs environnementaux avec les mécanismes immunitaires de l'hôte chez les individus génétiquement sensibles (predisposition familiale). En France, la maladie de Crohn touche environ 1/1000 personne et la prévalence augmente depuis les années 1950. Cette maladie évolue par poussée et provoque une inflammation et un épaississement de la paroi du tube digestif, pouvant entraîner des ulcères et parfois des fissures et des perforations. Les symptômes de la maladie de Crohn ne sont observés que lors des phases de poussées (23). Les causes de la maladie de Crohn sont mal identifiées.

Facteurs environnementaux :

Ces derniers ne sont pas clairement identifiés mais ils sont indispensables à l'apparition de la maladie. La qualité de l'alimentation, l'utilisation de contraceptifs oraux sont évoqués comme facteurs environnementaux mais n'ont pas été confirmés. Le tabagisme est associé à un risque accru de développer la maladie de Crohn mais également à une augmentation de la gravité des

symptômes. La maladie de Crohn étant une maladie faisant intervenir des facteurs environnementaux et sa prévalence augmentant depuis 1950 en parallèle de l'augmentation de la production de plastiques, permettent de justifier de s'intéresser à l'impact de l'absorption de nanoplastiques au niveau de l'épithélium intestinal pour déterminer si la réponse engendrée par les cellules est majorée ou non par rapport aux cellules qui ne possèdent pas de gène associé à la maladie de Crohn.

Facteurs génétiques :

En ce qui concerne les facteurs génétiques de cette maladie, il existe de nombreux gènes de prédisposition favorisant l'apparition de la maladie. La mutation la plus fréquente est la mutation du domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides 2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2 ; NOD2) (24). La dénomination de ce gène peut également être CARD15 (caspase recruitment domain-containing protein 15). La variante Nod2-1007fs serait la mutation la plus commune du gène Nod2 et associée à la maladie de Crohn (25,26). Ce gène multiplie par 5 le risque de souffrir de cette maladie et il code pour des protéines impliquées dans le fonctionnement du système immunitaire. L'interaction des facteurs génétiques et environnementaux entrainerait le système immunitaire de ces personnes à attaquer les cellules de la paroi du tube digestif. En ce sens, la maladie de Crohn est une maladie auto-immune.

1.4. Modèles d'épithélium intestinal

L'intestin constitue le principal lieu d'absorption lors d'une ingestion ou d'une administration de médicaments par voie orale. Différents modèles intestinaux in vitro ont été utilisés dans cette étude, et notamment des mono- et des co-cultures de cellules humaines. Afin d'évaluer la toxicité de nanoplastiques, plusieurs modèles d'épithélium intestinal de complexité croissante ont été mis en place.

1.4.1. Cellules

Cellules Caco2

La lignée cellulaire Caco2 dérive d'une tumeur colique humaine et a la capacité de se différencier en entérocytes (27), c'est-à-dire en cellules épithéliales polarisées en culture. Deux lignées cellulaires ont été dérivées de la lignée Caco-2 : la lignée Caco-2-LV-Nod2^{1007fs} et la

lignée Caco-2-LV-Nod2 WT (wildtype). Ces lignées ont été obtenues par transfection. La transfection d'un gène consiste en l'introduction de matériel génétique (acides nucléiques nus ou purifiés) exogène dans des cellules eucaryotes. Ici, la transfection a été réalisée par notre collaborateur Frédérick Barreau (INSERM IRSD), via un lentivirus (LV) portant le gène Nod2 WT ou un LV portant le gène Nod2 muté dans le site 1007fs. Cette mutation est très fréquemment retrouvée chez les patients atteints de la maladie de Crohn ; la lignée Caco-2-LV-Nod2^{1007fs} constitue donc un modèle *in vitro* de prédisposition à cette maladie. Les effets des nanoplastiques sont donc évalués sur cette lignée ainsi que sur la lignée équivalente mais ne présentant pas de prédisposition génétique à la maladie, qui est la lignée Caco-2-LV-Nod2 WT.

Cellules HT29-MTX

Les cellules HT29-MTX sont des cellules caliciformes sécrétrices de mucus. Le mucus produit par les monocouches de cellules caliciformes humaines constitue une barrière importante aux composés lipophiles (28).

1.4.1. Modèles en coculture en 2 dimensions d'épithélium intestinal humain

Coculture d'épithélium intestinal humain sain

Dans un premier temps, un modèle d'épithélium intestinal humain, consistant en une coculture d'entérocytes et de cellules caliciformes en 2 dimensions a été utilisé afin d'évaluer la toxicité de nanoplastiques de polystyrène de différentes tailles et à différentes concentrations. Pour cela, une coculture a été mise en place contenant 90 % de cellules de la lignée Caco2- LV-Nod2 WT et 10 % de cellules de la lignée HT29-MTX.

Bien que ce modèle ne possède pas la variété cellulaire que l'on retrouve dans un intestin, les entérocytes et les cellules caliciformes représentent les deux phénotypes majeurs de l'épithélium intestinal dans les proportions respectives de 90% et 10% (29,30).

Coculture d'épithélium intestinal humain muté

Dans un second temps, un modèle en coculture en deux dimensions avec des cellules mutées d'épithélium intestinal humain consiste en l'amélioration du précédent modèle par l'utilisation des cellules Caco2-LV-Nod2^{1007fs}, c'est-à-dire des cellules Caco2 qui auront été transfectées avec le gène de sensibilité à la maladie de Crohn : Nod2-1007fs.

L'utilisation de cellules ayant été transfectées avec le gène non muté (Caco2-LV-Nod2 WT) permettra donc de comparer les résultats avec les cellules transfectées avec le gène muté et servira donc de contrôle négatif.

Différenciation des cellules Caco2

Il a été permis aux cellules Caco2 dans les cocultures d'épithélium intestinal humain sain et muté de se différencier en entérocytes présentant des villosités (31,32).

1.5. Nanoplastiques de polystyrène

Des billes de polystyrène de différentes tailles (taille : 50 nm, 100 nm, 200 nm et 500 nm) et à différentes concentrations (0 – 200 µg/mL) ont été utilisées. Le polystyrène est parmi les plastiques les plus produits dans le monde et principalement utilisé dans les emballages alimentaire, l'isolation des bâtiments et les équipements électriques (1). Le PS constitue donc une pollution environnementale significative. D'autre part, il est commercialisé sous forme de billes en solution, à des tailles connues et avec des surfaces fonctionnalisées avec différents groupements chimiques fonctionnels. Pour ces raisons, des nano-billes de polystyrène ont été utilisées dans cette étude, ce qui était une première sur ce sujet dans ce laboratoire.

Le polystyrène étant hydrophobe, pour pouvoir le mettre en suspension aqueuse il faut qu'il soit rendu hydrophile. Ceci est possible grâce à la fonctionnalisation de surface des billes avec des groupements fonctionnels hydrophiles. Les billes dont la toxicité a été testée sont des nanoparticules de polystyrène modifiées par un groupement carboxyle (PS-COOH) ainsi que des billes de polystyrène fonctionnalisées avec un groupement amine (PS-NH₂).

1.6. Objectif de l'étude

Le but de cette étude est d'identifier la potentielle toxicité de ces plastiques sous forme nanoparticulaire en mimant l'exposition par voie orale et le phénomène d'absorption intestinal grâce à des modèles d'épithélium intestinal. Un modèle d'épithélium sain et un modèle d'épithélium comportant des cellules porteuses d'un gène associé à la maladie de Crohn ont été utilisés. Une batterie d'essais toxicologiques a été réalisée sur chacun des modèles d'épithélium intestinal. Les résultats ont ainsi pu être comparés pour déterminer l'impact des nanoparticules

de PS sur un épithélium intestinal sain et prédisposé à la maladie de Crohn. Dans un premier temps, j'ai déterminé la cytotoxicité de ces billes de polystyrène avec un test de viabilité cellulaire sur monoculture puis sur coculture en 2 dimensions d'épithélium intestinal humain non différencié. J'ai quantifié les espèces réactives de l'oxygène afin de mettre en évidence un stress oxydant dans les cellules. Aussi, j'ai quantifié des médiateurs de l'inflammation. Enfin, j'ai réalisé des tests de génotoxicité afin de mesurer les cassures de brins d'ADN. J'ai réalisé ces mêmes tests sur des cocultures différenciées, lors d'une exposition aigue et chronique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Particules

Pour les expériences, des nanoparticules de polystyrène (NP-PS) ont été achetées chez Polysciences Europe GmbH, Hirschberg, Allemagne. Les NP-PS sont de forme sphérique avec des diamètres de 500 nm, 200 nm, 100 nm et 50 nm. La surface des billes est recouverte de groupement carboxylate (PS-COOH).

Des particules de polystyrène fonctionnalisées avec un groupement amine (PS-NH₂), avec une taille de 50 nm ont été utilisées. Le fournisseur est Merck (Sigma-Aldrich), référence L0780, 50 nm, fluorescent blue.

2.2. Culture cellulaire et exposition

Les cellules Caco2-LV-Nod2 WT et Caco2-LV-Nod2^{1007fs} nous ont été fournies par notre collaborateur Frédéric Barreau (INSERM IRSD, Toulouse). Elles sont dérivées de la lignée Caco-2 (ATCC HTB-37, passages 14 – 40), qui a été transfectée avec un lentivirus codant le gène Nod2 WT ou le gène Nod2^{1007fs}. Les cellules HT29-MTX sécrétrices de mucus nous ont été fournies par Thecla Lesuffleur, INSERM, qui les a développées par exposition chronique de cellules HT29 (ATCC) avec du méthothrexate (33) (passages 30 – 50).

2.2.1. Décongélation

Les lignées cellulaires sont congelées avec du milieu de congélation (80% de milieu de culture, 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO)), dans des cryotubes stockés dans de l'azote liquide. Lors de la décongélation, les cellules décongelées sont mélangées à 9 mL de milieu de culture à 37 °C. La suspension est centrifugée 5 min à 470 rcf puis le surnageant est retiré afin d'éliminer le DMSO. Le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu de culture et la suspension cellulaire est placée dans une boîte de petri à l'incubateur à 37 °C et 5% de CO₂. Les cellules sont passées deux fois avant d'être utilisées pour les expériences.

2.2.2. Maintien des cellules

Les cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/GlutaMAX™, 10% de SVF non décomplémenté, 1% d'acides aminés non essentiels, 50 unités/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine, à 37 °C dans un atmosphère humide à 5% de CO₂.

Les cellules Caco2-LV-Nod2 WT ; Caco2-LV-Nod2^{1007fs} et HT29-MTX ont poussé en monoculture ou en co-culture à raison de 90% de Caco2-LV-Nod2 WT ou Caco2-LV-Nod2^{1007fs} et 10% de HT29-MTX, qui est un modèle de cellule intestinale sécrétrice de mucus (34). Dans chacun des cas, les cellules étaientensemencées à une densité cellulaire de 83000 cellules/cm², dans des boîtes de petri ou des plaques multi-puits.

○ Cellules non différenciées

Pour réaliser les tests sur cellules non différenciées, les cellules étaient exposées aux particules de polystyrène diluées dans du milieu de culture cellulaire 24 heures après l'ensemencement (Figure 2).

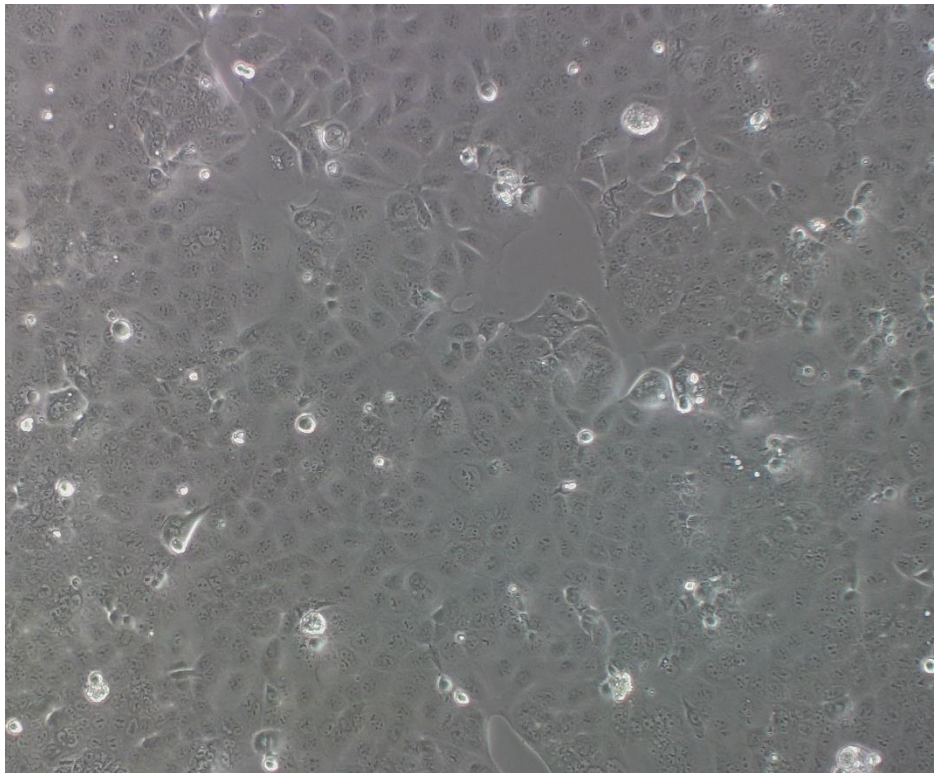


Figure 2 : Coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX (90%-10%) 24h après l'ensemencement.

○ Cellules différenciées

Les cellules Caco2 ont la capacité de se différencier en entérocytes avec des villosités et des jonctions serrées (31,32). Ainsi le modèle d'épithélium en coculture, lorsque les cellules Caco-2 sont différenciées et que les HT29-MTX produisent du mucus, est plus représentatif de la structure de la barrière intestinale qu'un modèle de monoculture de cellules Caco-2. Pour différencier l'épithélium, nous avons ensemencé des plaques multi-puits avec des Caco2-LV-Nod2 WT ou Caco2-LV-Nod2^{1007fs} et des HT29-MTX (90% - 10%) et avons permis la différenciation cellulaire pendant 17 jours en changeant le milieu de culture tous les 3 à 4 jours (Figure 3).

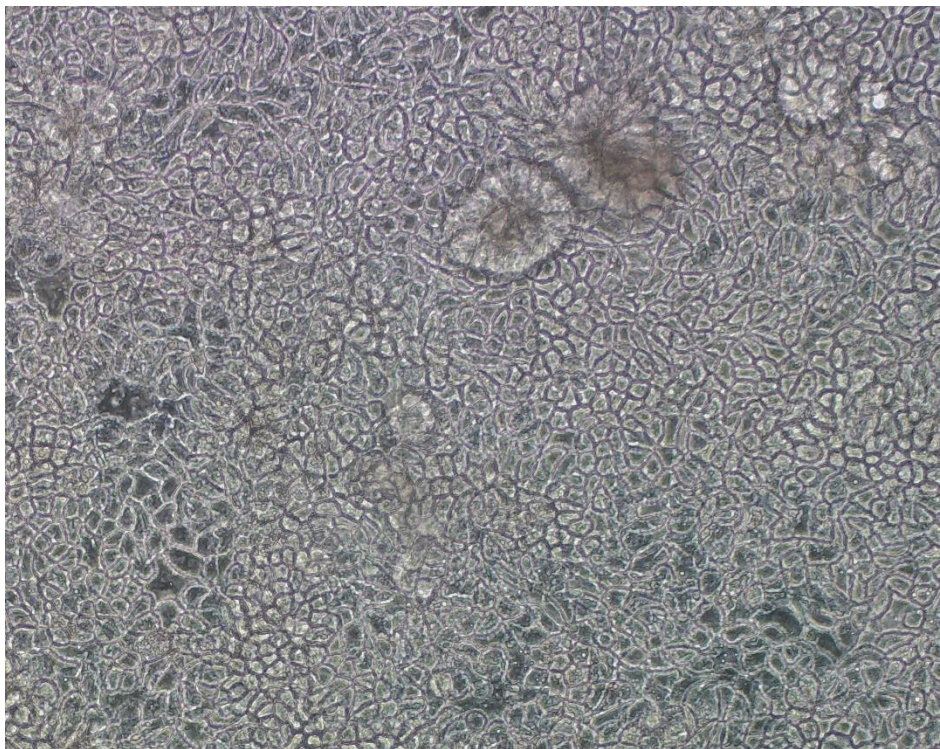


Figure 3 : Coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX (90% - 10%) différenciées 17 jours.

Sur cellules non différenciées, les tests de cytotoxicité, de quantification des espèces réactives de l'oxygène, de génotoxicité et d'inflammation par ELISA ont été réalisés 3 fois, avec 3 réplicats biologiques par expérience.

Les tests réalisés sur cellules différenciées n'ont pu être réalisés qu'une seule fois, avec 3 réplicats biologiques.

2.3. Exposition aux nanoparticules de polystyrène

Pour que la quantité de PS soit équivalente, le volume d'exposition a été ajusté pour que le rapport volume de milieu/surface du puit soit équivalent dans tous les types de plaque. Ainsi, 100 µL de PS étaient ajoutés à chaque puit dans les plaques 96 puits et 1,25 mL dans les puits des plaques 12 puits.

2.3.1. Exposition aigue

Pour l'exposition aigue des cellules, les PS ont été diluées dans du milieu de culture pour atteindre la concentration souhaitée. Les cellules ont été exposées pour une durée de 24 heures.

2.3.2. Exposition chronique

L'exposition répétée, mimant une exposition chronique a été conçue pour exposer les cellules à de plus faibles doses et pendant un temps plus long, ce qui est plus représentatif de l'exposition réelle des populations. Pour l'exposition chronique des cellules, les PS ont été ajoutées tous les jours pendant 4 jours consécutifs, et le test était réalisé le 5^{ème} jour.

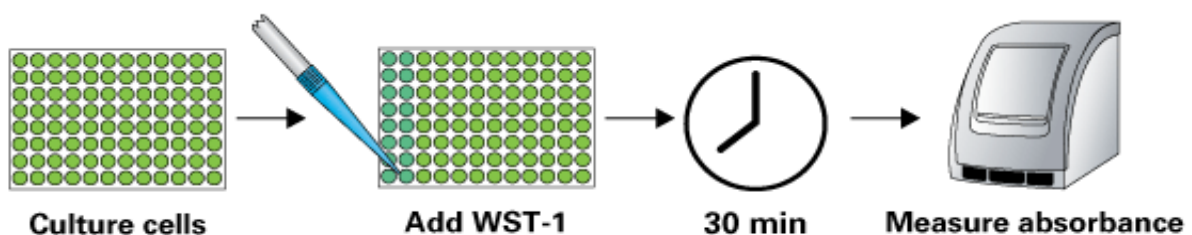
Pour avoir une équivalence relative entre les tests d'exposition aigue et chronique, la concentration de PS cumulée, au 4^{ème} jour de l'exposition chronique, était égale à la concentration à laquelle les cellules étaient exposées en aigu. Par exemple, pour l'exposition en aigu à 50 µg/mL, il était ajouté lors de l'exposition chronique 12,5 µg/mL de PS par jour pendant 4 jours. Ce qui signifie que les cellules ont été exposées pendant 24 h à 12,5 µg/mL, puis pendant 24 h à 25 µg/mL, puis pendant 24 h à 37,5 µg/mL, et enfin pendant 24 h à 50 µg/mL. Ainsi, au 4^{ème} jour d'exposition chronique la concentration cumulée était de 50 µg/mL mais le niveau d'exposition est bien plus important dans l'exposition répétée que dans l'exposition aigue.

2.4. Test de viabilité cellulaire

La mesure de la viabilité cellulaire est un test sensible, fiable et rapide. Le principe du test est de mesurer le métabolisme cellulaire afin de déterminer le nombre de cellules vivantes dans

l'échantillon. La cytotoxicité engendrée par les NP-PS a été déterminée en réalisant le test colorimétrique WST-1 (Roche, Basel, Switzerland, revendu par Merck, référence CELLPRO-RO). D'un point de vue chimique, le réactif WST-1 est composé d'un sel de tétrazolium qui est ajouté au milieu de culture. Les sels de tétrazolium sont clivés en formazan par des enzymes cellulaires (déshydrogénases mitochondriales) qui ne sont actives que dans les cellules métaboliquement actives, donc vivantes. Le formazan est un colorant dont la quantification est possible grâce à un spectrophotomètre. Ainsi, la quantité de formazan est corrélée au nombre de cellules métaboliquement actives dans la culture.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits transparents, à raison de 25000 cellules par puits. 24 heures après l'ensemencement pour les cellules non différenciées ou au 17^{ème} jour pour les cellules différenciées, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été exposées aux billes de polystyrène PS-COOH de 500 nm ; 200 nm ; 100 nm et 50 nm et aux PS-NH₂ de 50 nm à des concentrations allant de 0 à 200 µg/mL, avec 100 µL par puit, pendant 24 heures pour l'exposition aiguë. Pour l'exposition chronique, seules les PS-COOH 50 nm et 500 nm et les PS-NH₂ ont été testées. Le milieu d'exposition a ensuite été remplacé par 100 µL de WST-1 dilué au 1:10 (v/v) dans du milieu de culture sans SVF et les plaques ont été incubées pendant 90 min à 37 °C. Ensuite, les résultats ont été obtenus en réalisant une mesure de l'absorbance des puits sur un spectrophotomètre SpectraMax ID3 (molecular devices, Sunnyvale, CA) aux longueurs d'ondes 450 et 650 nm (Figure 4). Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cellules viables après normalisation par rapport au contrôle négatif (cellules non traitées).



*Incubation time ranges from 30 min to 4 hr, depending on cell type and density.

Figure 4 : Schéma explicatif du test WST-1.

Certaines nanoparticules ont la propriété d'absorber la lumière à certaines longueurs d'onde, ou d'émettre une fluorescence. Celles-ci peuvent donc interférer avec les tests de toxicité in vitro

(35). Pour évaluer l'interférence optique des nanoparticules de polystyrène avec le test WST-1, après les 24 h d'exposition cellulaire et les 90 min d'exposition au WST-1, 50 µL de solution ont été prélevés dans chaque puit et déposés sur une nouvelle plaque 96 puis, après centrifugation à 200 ref pendant 5 min, ainsi le milieu prélevé ne contient plus de nanoparticules. La mesure de l'absorbance a été réalisée selon le même protocole et les données ont été comparées avec celles obtenues sans cette étape de centrifugation.

2.5. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Le stress oxydatif se produit lorsque l'équilibre entre la production intrinsèque de ROS et l'activité anti-oxydante de la cellule est rompu. L'activité anti-oxydante est portée par des enzymes et des molécules antioxydantes qui suppriment les ROS, telles que le glutathion, la catalase, la superoxyde dismutase. Les ROS sont produites par divers processus cellulaires et principalement lors de la chaîne respiratoire située dans la mitochondrie. Elles sont prises en charge par les systèmes anti-oxydants sauf si ceux-ci sont inactivés. Dans ce cas les ROS s'accumulent, et on parle de stress oxydant. Des ROS peuvent également être générées par les nanoparticules accumulées dans les cellules, si la surface de celles-ci est réactive. Il a alors aussi une augmentation du contenu cellulaire en ROS, et apparition d'un stress oxydant. Les ROS peuvent alors créer des dommages aux acides désoxyribonucléiques (ADN) ou aux autres constituants de la cellule (protéines, lipides ...). Ainsi, mesurer le contenu intracellulaire de ROS permet une évaluation du stress oxydant cellulaire.

La dihydrorhodamine 123 (DHR123) est un colorant non fluorescent, lipophile qui diffuse à travers la membrane cellulaire et permet la mise en évidence de ROS. A l'intérieur de la cellule, la DHR 123 est oxydée par les ROS en rhodamine 123 qui présente une fluorescence verte. Lorsque que le colorant est oxydé en rhodamine 123, il se localise dans les mitochondries (Figure 5).

Les espèces réactives de l'oxygène intracellulaire ont été quantifiées grâce à la DHR123 (Thermo Fisher Scientific, ref D23806). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits noires à raison de 25000 cellules par puit 24 heures avant l'exposition au réactif. 100 µL de réactif DHR123, préalablement dilués au 1:1000 (v/v) dans du tampon phosphate salin (PBS), ont été ajoutés dans chacun des puits et les plaques ont été placées 45 min à l'incubateur,

à 37 °C, 5% CO₂. Après ce temps d'incubation, la DHR123 est éliminée et les cellules sont exposées aux billes de polystyrènes PS-COOH de 500 nm ; 200 nm ; 100 nm et 50 nm et a des billes de polystyrène amino-modifiées (PS-NH₂ 50 nm) à des concentrations de 0 à 50 µg/mL, avec 100 µL par puit. Une étude de la cinétique d'apparition de la fluorescence de la rhodamine 123 a été réalisée avec des mesures prises du temps 0 au temps 24 h. L'intensité de la fluorescence a été mesurée aux longueurs d'onde d'excitation à 480 nm et d'émission à 530 nm, sur un SpectraMax ID3 (molecular devices, Sunnyvale, CA). Un contrôle positif a été réalisé avec une solution de Luperox à 1 mM. Les résultats pour chaque condition sont comparés au contrôle négatif.

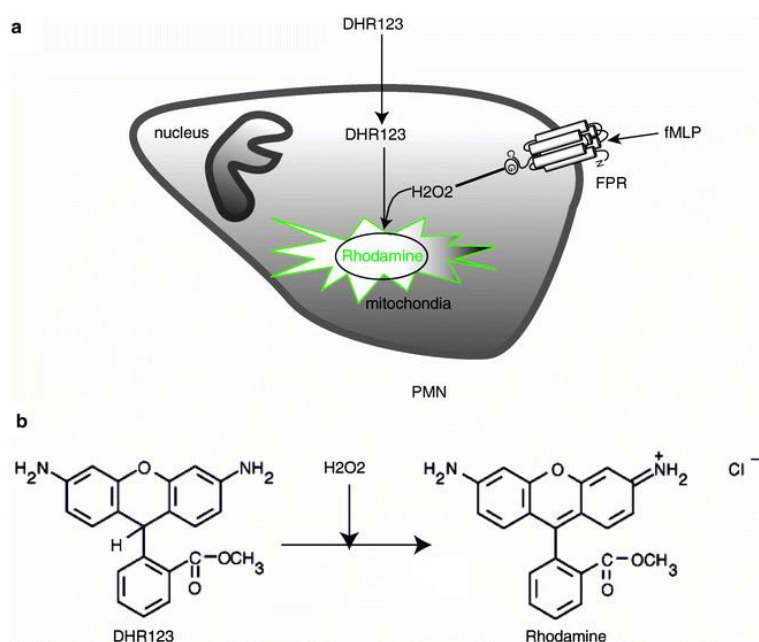


Figure 5 : Réaction chimique au sein de la mitochondrie transformant la DHR123 en Rhodamine, composé fluorescent, en présence de ROS.

L'interférence potentielle des billes de polystyrènes a été testée en mesurant leur fluorescence dans les mêmes conditions que celles du test mais dans des plaques sans cellule. Un test d'interférence a été réalisé avec les PS dans du milieu pour déterminer si les nanoparticules émettent une fluorescence ou sont capables, à l'inverse, de diminuer la fluorescence du milieu. Un autre test d'interférence a été effectué avec les PS dans du milieu où 10% de réactif DHR123 dilué au 1:1000 a été rajouté. Ce test permet de s'assurer que les PS n'oxydent pas le DHR123 en rhodamine en l'absence de cellules, ce qui causerait l'apparition d'une fluorescence.

2.6. Test de génotoxicité

Le test des comètes est une technique d'électrophorèse sur gel monocellulaire (SCGE) qui permet de quantifier les dommages à l'ADN (cassures de brins et sites alcali-labiles, tels que les sites abasiques) dans les cellules individualisées et donc de déterminer la génotoxicité d'une substance ou d'un produit (36). Les cellules sont incluses dans un gel d'agarose déposé sur une lame de microscopie, puis la membrane des cellules et la paroi nucléaire sont lysées pour mettre l'ADN à nu. Ensuite, les cellules sont placées dans un champ d'électrophorèse en conditions alcalines, ce qui transforme les cassures simple brin de l'ADN et les sites abasiques en cassures double brin. Si l'ADN est endommagé, alors les fragments migreront sous l'effet du champ électrique. Le résultat obtenu par ce test est une image ressemblant à une comète avec une tête composée d'ADN intact, qui était initialement le noyau cellulaire, et une queue constituée de fragments d'ADN ayant migré (Figure 6). L'ADN est révélé par un agent fluorescent. Le pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète par rapport à la tête est quantifié par la mesure de l'intensité de fluorescence. La quantité d'ADN dans la queue de la comète est directement proportionnelle à la quantité d'ADN endommagé, ce qui définit le taux de cassures à l'ADN dans les cellules (Figure 7).

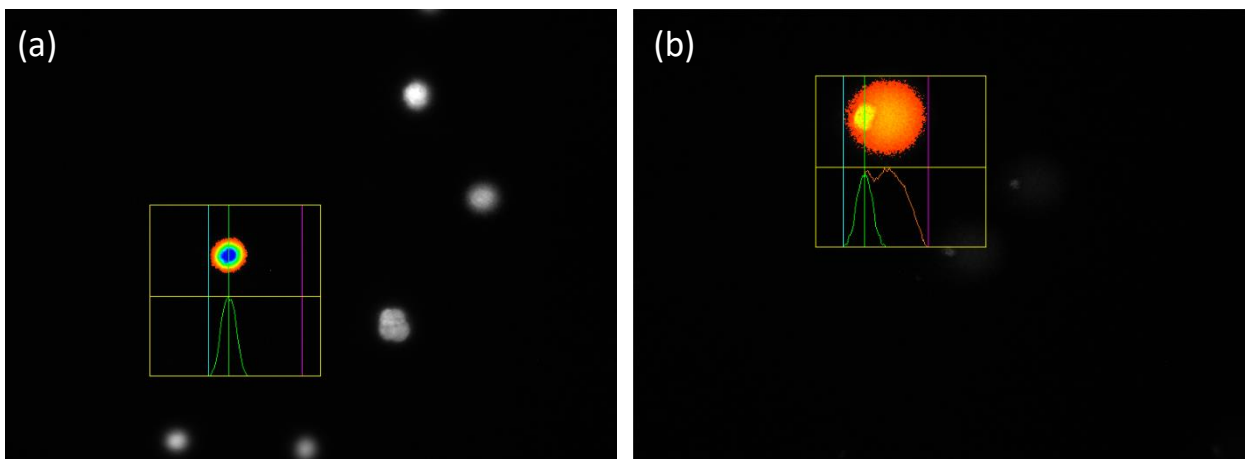


Figure 6 : Test des comètes sur coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX.

(a) et (b) sont de l'ADN cellulaire visualisé grâce au microscope à fluorescence et au logiciel Comet Assay IV. (a) ADN issu de cellules non exposées (contrôle négatif) : % d'ADN dans la queue de la comète = 0,11%. (b) ADN issu de cellules exposées à du MMS à 30 µg/mL (contrôle positif), % d'ADN dans la queue de la comète = 66,92%.

Pour ce test, les cellules ont été cultivées dans des plaques 12 puits à raison de 300 000 cellules par puit. 24 h après l'ensemencement ou après différenciation pendant 17 jours, les cellules ont été exposées aux billes de polystyrènes PS-COOH de 500 nm ; 200 nm ; 100 nm et 50 nm et

des PS-NH₂ à des concentrations de 0 à 50 µg/mL pendant 24h ou de manière répétée pendant 4 jours, puis récoltées et stockées à -80 °C dans du milieu de congélation (tampon citrate 0,1 M, sucrose 85,5 g/L, DMSO 50 mL/M, pH 7,6 ajusté avec de l'acide citrique). Les cellules ont ensuite été incorporées dans 0,5% d'agarose à bas point de fusion et déposées sur des lames de verre préalablement enduites d'agarose à 1% (deux gels par lame). Les lames ont été placées sur de la glace pour permettre à l'agarose de solidifier. Après lyse cellulaire par immersion dans du tampon de lyse (2,5 M de chlorure de sodium (NaCl), 0,1 M d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), 10 mM de Tris, 1% de Triton, pH 10), pendant 1h à l'obscurité à température ambiante, les lames ont été rincées dans du PBS 1x. Les lames ont été placées dans la cuve d'électrophorèse (cleaver scientific), avant immersion dans un tampon d'électrophorèse froid (NaOH 0,3 M, EDTA 1 mM, 4°C) pendant 40 min pour permettre à l'ADN de se dérouler. L'électrophorèse a été réalisée à 1,2 V/cm pendant 30 min. Les lames ont été neutralisées par deux lavages pendant 10 min dans du PBS puis colorées au Gel Red (Thermo Fisher Scientific) dilué au 1:10000ème. Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète a été mesuré sur 50 noyaux par gel en utilisant le logiciel Comet Assay IV (Perceptive Instruments, Bury St Edmunds, UK). En tant que contrôle positif, des cellules ont été exposées à 30 µg/mL de méthyl méthanesulfonate (MMS) pendant 24 h. Un second contrôle positif a été réalisé sur des lames de contrôle (cellules non exposées) qui ont été exposées à 5 mM de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) après fixation dans l'agarose à bas point de fusion. Les expériences ont été réalisées en 3 répétitions indépendantes, avec deux réplicats techniques par répétition indépendante. Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète est mesuré en tant que %Tail DNA. Sur les 50 comètes, la médiane des mesures est calculée permettant ainsi d'avoir une médiane par expérience. La moyenne et l'écart type des trois médianes issues des trois expériences indépendantes sont ensuite calculés.

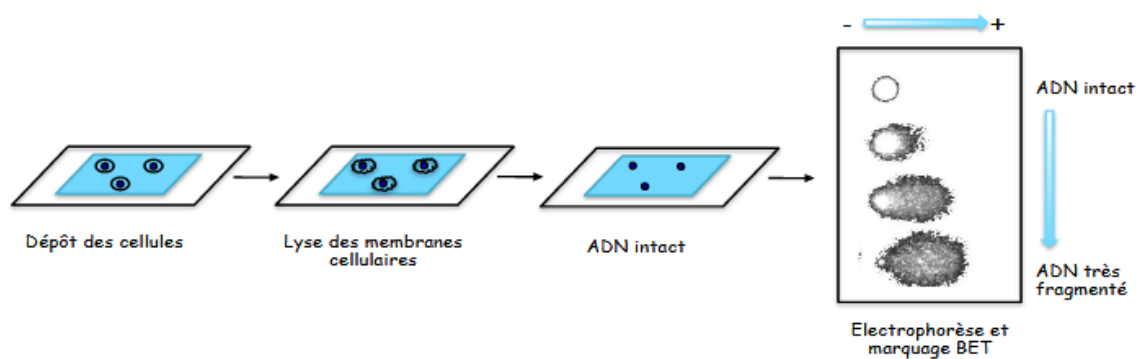


Figure 7 : Principe du test des comètes. (37)

2.7. Inflammation

Test ELISA

La méthode immuno-enzymatique ELISA ou enzyme-linked immunosorbent assay c'est-à-dire dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, permet de doser spécifiquement une protéine. Ici, les protéines de l'inflammation interleukine-1 β (IL-1 β) et interleukine-8 (IL-8) ont été quantifiées.

Les cellules en coculture, différenciées ou non, ont été exposées aux PS de différentes tailles et à différentes concentrations soit en aigüe (24 heures) soit en chronique (4 jours). Après l'exposition, le surnageant des cellules a été récupéré puis stocké dans des tubes eppendorf de 1,5 mL à -80°C. L'inflammation est un mécanisme de défense des cellules face à l'exposition aux PS, par lequel les cellules sécrètent des médiateurs de l'inflammation comme l'IL-1 β et l'IL-8 pour activer le système immunitaire.

Le test ELISA repose sur les propriétés du complexe anticorps-antigène, où les anticorps sont dirigés contre des antigènes particuliers. Au fond d'une plaque 96 puits sont fixés les anticorps spécifiques (anticorps anti-IL-1 β ou anticorps anti-IL-8). Lors de l'ajout des échantillons à tester, si les IL-1 β ou IL-8 sont présentes dans le surnageant, elles se fixeront spécifiquement sur les anticorps de capture du fond des puits. Un anticorps de détection est ajouté (anticorps anti-IL-1 β biotinylé ou anticorps anti-IL-8 biotinylé), qui reconnaît spécifiquement IL-1 β ou IL-8 et permet l'amplification et la détection du signal. Les anticorps de détection sont associés à une enzyme, la peroxydase. L'ajout de la solution de substrat, qui associe la tetraméthylbenzidine (TMB) avec du peroxyde d'hydrogène va agir sur la peroxydase en créant une réaction colorée. L'absorbance des puits contenant soit IL-1 β soit IL-8 est mesurée à 450 nm (Figure 8). La valeur de l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration en interleukine recherchée. Une gamme d'étalonnage est réalisée avec des standards IL-1 β ou IL-8 dont la concentration est connue. Ainsi, l'équation de la courbe peut être déterminée et la concentration en IL-1 β ou IL-8 des échantillons peut être calculée à partir des valeurs d'absorbances.

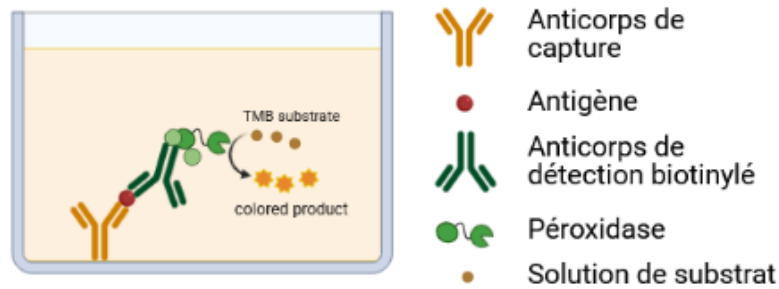


Figure 8 : Principe du test ELISA.

Pour la réalisation du test, les kits ELISA IL1beta et IL8 (BD OptEIA™, BD Biosciences) ont été utilisés dans des plaques 96 puits non stériles. Dans un premier temps, 100 µL d'anticorps de capture (1/250) (IL-8 ou IL-1β) dilués dans un tampon de revêtement ont été mis dans chacun des puits et incubés toute la nuit à 4°C.

Tous les lavages et incubations ont été effectués à température ambiante (20-22°C).

Une fois les anticorps de capture fixés au fond des puits, chaque puit est lavé 3 fois avec 200 µL de tampon de lavage (PBS avec 0,05% de Tween-20). Ensuite, 200 µL de diluant de dosage (PBS avec 10% de SVF) ont été ajoutés à chaque puit pendant 1 heure afin de bloquer les sites non spécifiques et réduire le bruit de fond lors de la lecture puis les puits ont été lavés 3 fois avec la solution de lavage.

Pour réaliser la gamme d'étalonnage afin de déterminer la concentration en interleukine dans les échantillons, un standard d'IL-8 a été utilisé aux concentrations 200 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12,5 pg/mL, 6,3 pg/mL, 3,1 pg/mL et 0 pg/mL. Pour le test ELISA permettant de quantifier IL-1β, les concentrations en IL-1β de la gamme d'étalonnage sont de 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL, 7,8 pg/mL, 3,9 pg/mL et 0 pg/mL. Afin que les absorbances des échantillons testés aient des valeurs comprises entre la plus faible et la plus élevée des valeurs de la gamme d'étalonnage, certains échantillons ont été dilués au demi, au dixième ou au centième. 100 µL de standards, d'échantillons et contrôles ont été déposés dans les puits appropriés pendant une durée de 2 heures, avant d'effectuer 5 lavages à la suite de l'incubation des échantillons.

Pour le test ELISA IL-8, 100 μL d'anticorps de détection (1/500) et de réactif enzymatique (1/250) ont été ajoutés dans chaque puit et les plaques ont été incubées pendant 1 heure. Pour le test ELISA IL-1 β , 100 μL d'anticorps de détection (1/1000) sont ajoutés et incubés pendant 1 heure puis 5 lavages sont réalisés avant d'ajouter 100 μL par puit de réactif enzymatique (1/250) pendant 30 minutes.

Ensuite, 7 lavages successifs ont été réalisés en laissant tremper chaque lavage 1 minute dans chaque puit. A la suite des lavages, 100 μL de solution de substrat sont ajoutés et incubés pendant 30 minutes à l'obscurité. La solution de substrat est du tetraméthylbenzidine (TMB) associé à du peroxyde d'hydrogène. Enfin, 50 μL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 1 molaire sont ajoutés afin de stopper la réaction. L'absorbance est mesurée moins de 30 minutes plus tard grâce à un spectromètre (SpectraMax ID3, Molecular Device) à la longueur d'onde de 450 nm avec une correction à la longueur d'onde 570 nm.

2.8. Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats a été réalisée avec l'interface RStudio du logiciel de statistiques R. Les résultats ne suivant pas les critères de normalité et d'homogénéité, les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ainsi que le test de comparaison multiple de Mann-Whitney ont été effectués. Le seuil de significativité α est fixé à 5%.

3. Résultats

3.1. Validation du modèle d'épithélium intestinal muté 1007fs

Le Muramyl Dipeptide (MDP) est la plus petite unité structurale active des peptidoglycanes. Le MDP est un composant majeur des membranes cellulaires des bactéries et est une molécule qui est exprimée de manière ubiquitaire par les bactéries, autant les Gram-négatifs que Gram-positifs. Le MDP est responsable de l'activité immunologique et a la capacité d'induire une inflammation. Le MDP est le ligand de NOD2, donc l'inflammation n'apparaît que lorsque les cellules présentent à leur surface une protéine NOD2 non mutée.

Le Lipopolysaccharide (LPS) est un composant de la paroi cellulaire bactérienne ayant la capacité d'induire une inflammation et une réponse immunitaire.

Des études ont montré qu'il y a une synergie entre le MDP et le LPS dans la réponse inflammatoire (38,39). L'exposition à ces deux molécules entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires.

L'activation de NOD2 par le MDP entraîne l'induction de la sécrétion d'interleukine-8 par les cellules mononucléaires et par conséquent le recrutement et l'activation des cellules neutrophiles. De ce fait, l'activation de NOD2 par le MDP a un rôle dans la réponse précoce aux pathogènes et l'amplification de la réponse immunitaire innée.

Dans la maladie de Crohn, la mutation 1007fs est associée à une perte de la réponse immunitaire innée face aux agents pathogènes et expliquerait les réponses immunitaires adaptatives anormales aux antigènes microbiens chez les patients atteints de la maladie de Crohn (40,41).

Afin de valider le modèle d'épithélium intestinal muté sur le gène Nod2, nous avons exposé les cocultures non différenciées de cellules WT et Nod2^{1007fs} à du LPS (10 µg/mL) en association à du MDP (1 µg/mL ; 2 µg/mL ou 5 µg/mL) pendant 24h et avons quantifié par un test ELISA l'IL-8 sécrétée dans le surnageant des cellules.

La concentration en IL-8 dans les échantillons en coculture WT augmente lorsque la concentration de MDP appliquée augmente ; elle est supérieure à celle mesurée dans le contrôle et dans la coculture mutée (Figure 9).

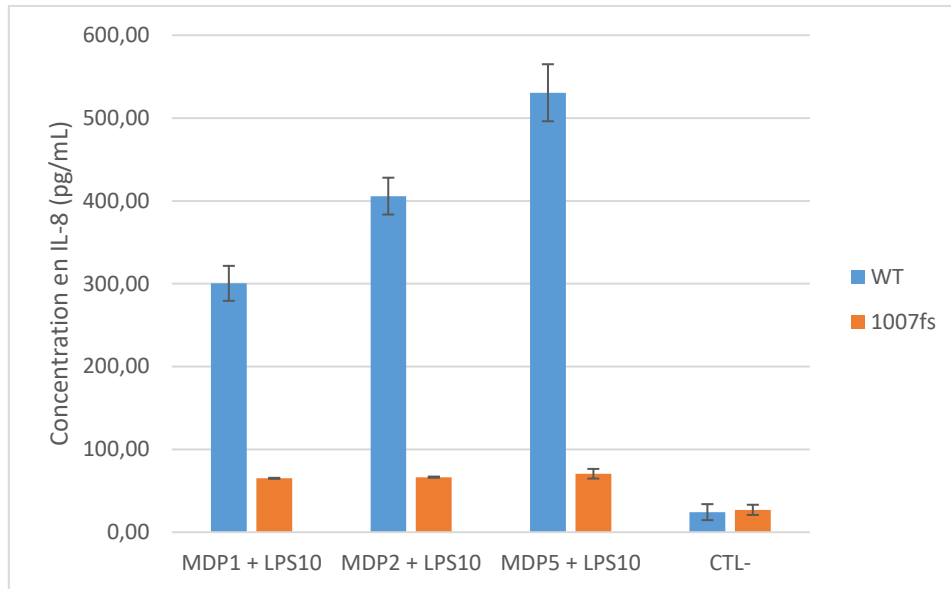


Figure 9 : Quantification des IL-8 par un test ELISA dans le surnageant des cellules ayant été exposées à du MDP (0µg/mL ; 1µg/mL ; 2µg/mL ou 5µg/mL) et du LPS (0µg/mL ou 10µg/mL).

Il y a donc bien une corrélation entre la mutation du gène Nod2 et la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, la variante 1007fs du gène Nod2 entraîne une modification de la réponse inflammatoire puisque les cellules mutées produisent moins d'IL-8 lors de l'exposition au MDP+LPS par rapport aux cellules non mutées. Ces résultats sont en accord avec la littérature (40,42).

3.2.Cytotoxicité

Les cellules ont été exposées aux billes de polystyrène de 500 nm ; 200 nm ; 100 nm et 50 nm aux concentrations de 0 µg/mL ; 6,25 µg/mL ; 12,5 µg/mL ; 25 µg/mL ; 50 µg/mL et 100 µg/mL, pour une durée de 24h dans la condition aiguë et tous les jours pendant 4 jours pour la condition chronique.

Le test WST-1 a été réalisé sur des monocultures de cellules Caco2-LV-Nod2 WT et Caco2-LV-Nod2^{1007fs} non différenciées et des monocultures de cellules HT29-MTX. En parallèle, l'essai a été réalisé sur une coculture non différenciée de Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX

ainsi que sur une coculture de cellules Caco2-LV-Nod2^{1007fs} non différenciée et HT29-MTX (90% / 10%).

Le test de cytotoxicité des PS a aussi été réalisé sur coculture de cellules HT29-MTX / Caco2-LV-Nod2 WT ou Caco2-LV-Nod2^{1007fs} différenciées 17 jours (10% / 90%) et soumises à une exposition aiguë et chronique aux PS-COOH 500 nm et 50 nm, ainsi qu'aux PS-NH₂.

3.2.1. Cytotoxicité sur cocultures non différenciées

La viabilité cellulaire n'a pas été altérée par l'exposition aux particules PS-COOH jusqu'à la concentration la plus élevée de 100 µg/mL, que ce soit dans les tests en monoculture ou en coculture et sans distinction de taille des particules. En effet, l'activité métabolique des cellules est toujours supérieure à 80% de celles des cellules contrôles, comme rapporté ici sur le test effectué sur les cocultures de Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et de Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX. Par analogie, il est considéré que 80% des cellules sont viables après une exposition de 24 heures aux particules de polystyrène. Cependant, il est observé une baisse significative de l'activité métabolique par rapport au contrôle sur la coculture Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX, à la concentration la plus élevée de 100 µg/mL pour toutes les PS-COOH et à la concentration de 50 µg/mL pour les PS-COOH de 50 nm (Figure 10). Il est également observé une diminution significative de l'activité métabolique sur la coculture mutée sur le gène Nod2 à la concentration la plus forte (100 µg/mL) pour les PS-COOH de toutes les tailles et à 50 µg/mL, l'activité métabolique est significativement inférieure à celle du contrôle pour les PS-COOH de 100 nm (Figure 11).

Nous pouvons en déduire que la viabilité cellulaire après une exposition de 24 heures aux particules de PS-COOH est supérieure à 80%. Par conséquent, nous considérons que les nanoparticules de PS-COOH n'ont pas d'action cytotoxique majeure sur les différents modèles d'épithélium intestinal humain utilisés dans cette étude.

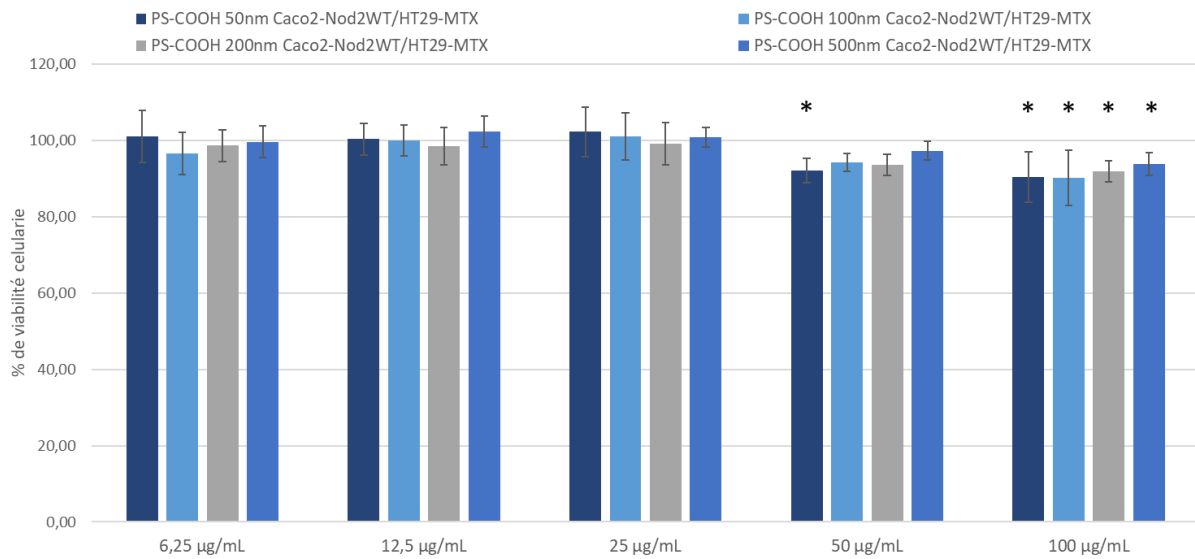


Figure 10 : Essais de cytotoxicité sur coculture non différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX. La viabilité cellulaire après 24h d'exposition aux PS-COOH de taille 50 nm ; 100 nm ; 200 nm et 500 nm a été évaluée à l'aide du test WST-1, aux concentrations 0 µg/mL ; 6,25 µg/mL ; 12,5 µg/mL ; 25 µg/mL ; 50 µg/mL et 100 µg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Les valeurs moyennes ± l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, cellules exposées vs contrôle.

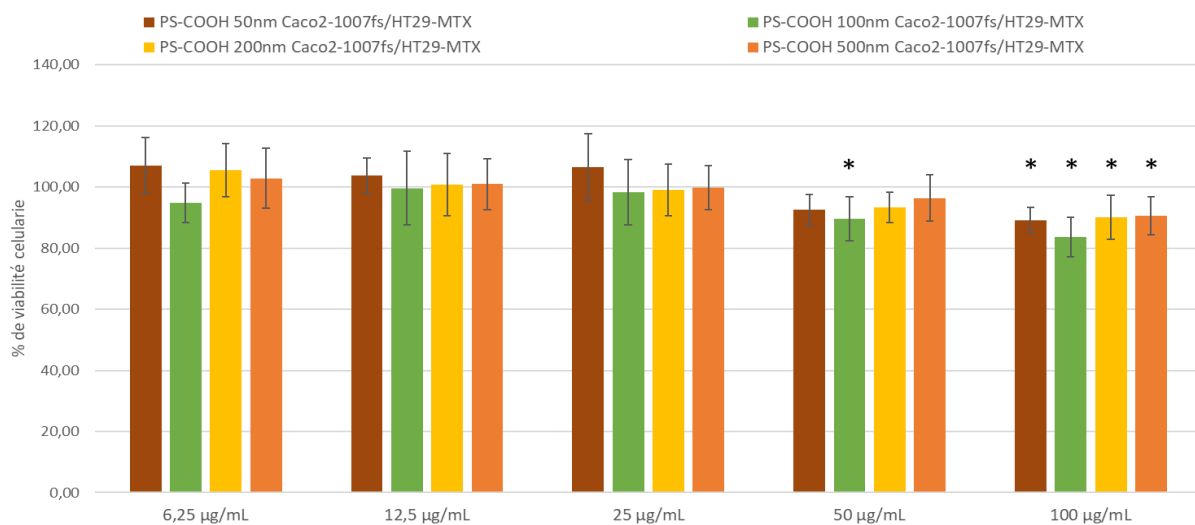


Figure 11 : Essais de cytotoxicité sur coculture non différenciée de Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX. La viabilité cellulaire après 24h d'exposition aux PS-COOH de 50 nm ; 100 nm ; 200 nm et 500nm a été évaluée à l'aide du test WST-1, aux concentrations 0 µg/mL ; 6,25 µg/mL ; 12,5 µg/mL ; 25 µg/mL ; 50 µg/mL et 100 µg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Les valeurs moyennes ± l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, cellules exposées vs contrôle.

Il semblerait que les cellules HT29-MTX soit par ailleurs légèrement moins sensibles à l'exposition aux nanoparticules de polystyrène. En effet, la viabilité cellulaire est plus élevée lors des tests sur la monoculture de cellules HT29-MTX puisqu'elle n'est jamais inférieure à

90% (Figure 12). Ceci pourrait être dû à la couche de mucus qui se forme à la surface des monocultures de HT29-MTX ou des cocultures contenant des cellules HT29-MTX, le mucus pouvant faire office de barrière protectrice diminuant l'exposition des membranes cellulaires aux NP-PS (43).

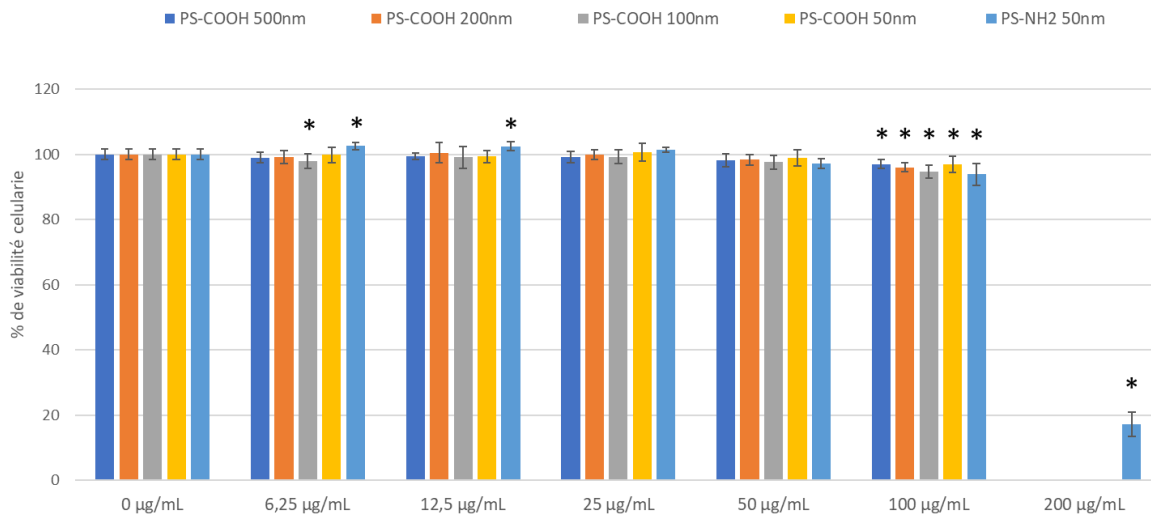


Figure 12 : Essais de cytotoxicité sur monoculture de cellules HT29-MTX.

La viabilité cellulaire après 24h d'exposition aux PS-COOH de taille 500 nm ; 200 nm ; 100 nm et 50 nm et aux PS-NH2 50 nm a été évaluée à l'aide du test WST1, aux concentrations 0 µg/mL ; 6,25 µg/mL ; 12,5 µg/mL ; 25 µg/mL ; 50 µg/mL, 100 µg/mL et 200 µg/mL. Les résultats sont donnés en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Les valeurs moyennes \pm l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, cellules exposés vs contrôle.

Le test WST-1 a aussi été réalisé en exposant les cellules à des nanoplastiques de polystyrène amino-modifiés. Cela a permis d'une part de servir de contrôle positif aux tests effectués avec les PS-COOH puisque leur cytotoxicité a déjà été démontrée (44). Il a notamment été observé chez les cellules exposées aux PS-NH₂ une augmentation de la cytotoxicité à faible concentration menant à l'apoptose des cellules (45).

Ce test a également permis de mettre en évidence une différence de sensibilité entre les cocultures non mutées et mutées (Figure 13). Sur la coculture WT, l'activité métabolique est significativement diminuée par rapport au contrôle pour les concentrations 25 µg/mL ; 50 µg/mL ; 100 µg/mL et 200 µg/mL. Cependant, une augmentation significative de l'activité métabolique est observée à 6,25 µg/mL. Il pourrait s'agir de l'effet hormesis c'est-à-dire le fait que la cellule, lors d'une stimulation à faible dose par un agent générateur de stress, compense par diverses réponses adaptatives par le biais de stress cellulaire. La mise en évidence par le test WST-1 d'une augmentation de l'activité métabolique à cette dose pourrait donc être expliquée par une augmentation de l'activité cellulaire en réponse à un stress. Il pourrait aussi

s'agir d'un effet prolifératif causé par la présence de faibles quantités de ces PS-NH₂. Sur la coculture mutée, une diminution significative de l'activité métabolique, donc de la viabilité cellulaire est observée dès la plus faible concentration (6,25 µg/mL) jusqu'à la concentration la plus élevée (100 µg/mL). Lorsque les résultats de l'exposition aux PS-NH₂ sont comparés à chaque concentration entre les cocultures mutées et non mutées, il est systématiquement observé une diminution significative de l'activité métabolique des cocultures mutées par rapport aux WT. Ainsi, lors de l'exposition à des particules de PS cytotoxiques, la coculture portant un gène associé à la maladie de Crohn est plus sensible que la coculture ne portant pas de gène muté.

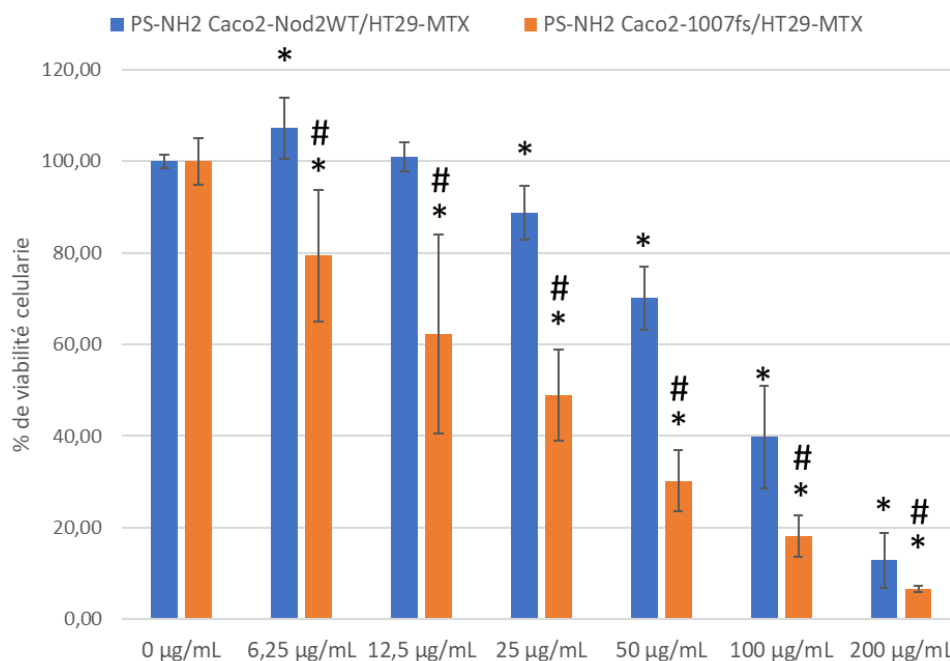


Figure 13 : Essais de cytotoxicité des PS-NH₂ sur coculture non différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX.

La viabilité cellulaire après 24h d'exposition aux PS-NH₂ de taille 50 nm a été évaluée à l'aide du test WST-1, aux concentrations 0 µg/mL ; 3,125 µg/mL ; 6,25 µg/mL ; 12,5 µg/mL ; 25 µg/mL ; 50 µg/mL, 100 µg/mL et 200 µg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Les valeurs moyennes ± l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, exposés vs contrôle, # p < 0,05, coculture Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX vs Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX.

3.2.2. Cytotoxicité sur coculture différenciée 17 jours

○ Exposition aigue

Le même test a été réalisé en exposant les cellules en coculture (WT ou mutée) différenciées pendant 17 jours aux PS-COOH de taille 500 nm et 50 nm et PS-NH₂, aux concentrations 0

$\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ et 200 $\mu\text{g/mL}$ pour une durée de 24h. Le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle est proche de 100% quelle que soit la concentration d'exposition aux PS-COOH. Les PS-COOH n'entraînent pas de mort cellulaire significative sur les deux types de coculture (WT et mutée) lorsque les cellules sont différenciées 17 jours (Annexe 1).

Par ailleurs, il est observé un effet cytotoxique des PS-NH₂ aux concentrations 100 $\mu\text{g/mL}$ et 200 $\mu\text{g/mL}$ puisque le pourcentage de cellules vivantes est inférieur à 80%. Il n'y a pas de différence entre les deux types de cocultures (Figure 14).

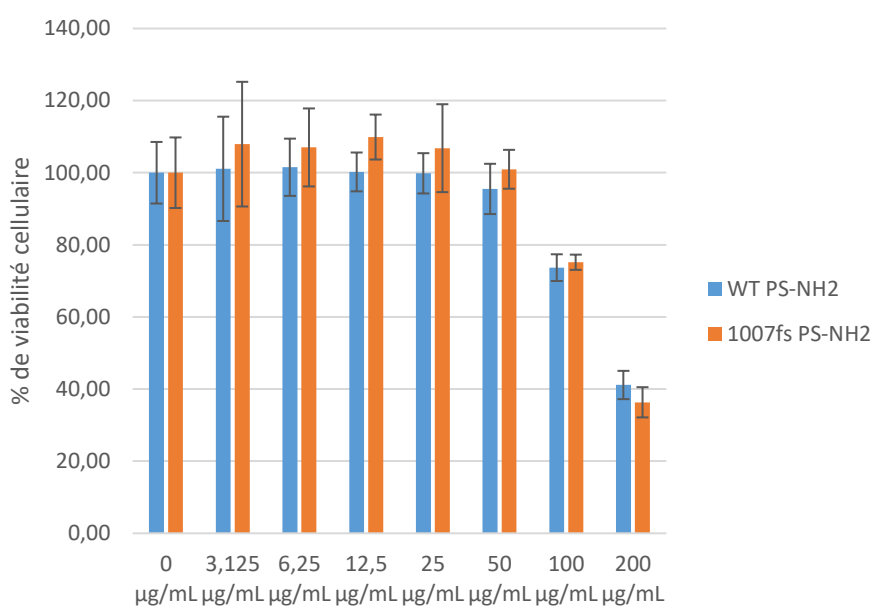


Figure 14 : Essais de cytotoxicité aigue des PS-NH₂ sur coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX différenciées 17 jours.

La viabilité cellulaire après 24h d'exposition aux PS-NH₂ de taille 50 nm a été évaluée à l'aide du test WST-1, aux concentrations 0 $\mu\text{g/mL}$; 3,125 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ et 200 $\mu\text{g/mL}$. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Graphe généré à partir des moyennes \pm l'écart type des 5 puits exposés par condition, l'expérience n'a été menée qu'une fois.

○ Exposition chronique

Lors de l'exposition chronique, les PS-COOH, à toutes les concentrations, ne montrent pas de cytotoxicité que ce soit sur la coculture WT ou mutée. Les résultats sont présentés en Annexe 2.

En ce qui concerne l'exposition aux PS-NH₂, elles présentent une cytotoxicité importante pour les deux cocultures, lors de l'exposition à 100 $\mu\text{g/mL}$ et 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 15).

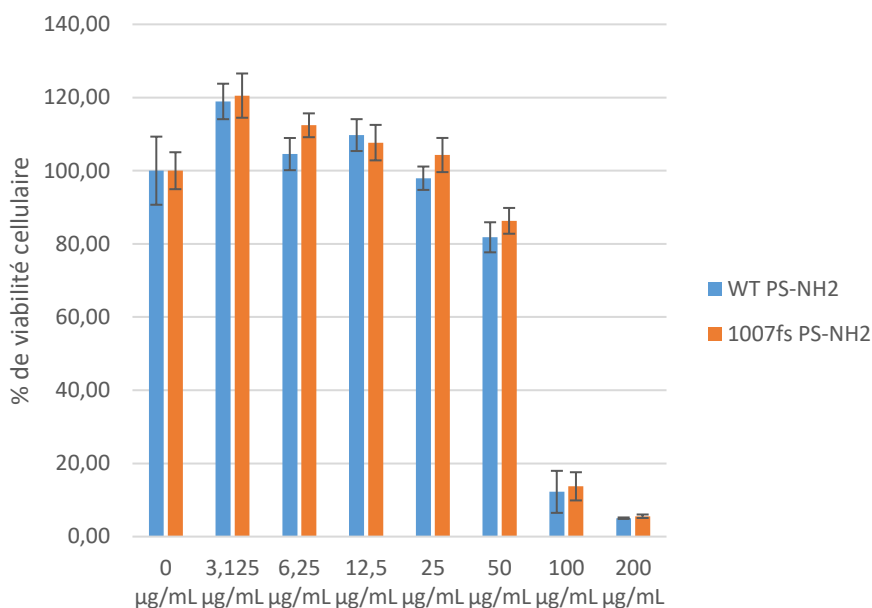


Figure 15 : Essais de cytotoxicité répétée des PS-NH₂ sur coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX différenciées 17 jours.

La viabilité cellulaire après 4 jours d'exposition aux PS-NH₂ de taille 50 nm a été évaluée à l'aide du test WST-1, aux concentrations finales 0 µg/mL ; 3,125 µg/mL ; 6,25 µg/mL ; 12,5 µg/mL ; 25 µg/mL ; 50 µg/mL, 100 µg/mL et 200 µg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Graphe généré à partir des moyennes ± l'écart type des 5 puits exposés par condition, l'expérience n'a été menée qu'une fois.

Comme sur le test réalisé sur cellules non différenciées, l'exposition à la plus faible concentration de PS-NH₂ entraîne une hausse du pourcentage de viabilité cellulaire qui pourrait être expliquée par l'effet hormesis. A 50µg/mL, le pourcentage de viabilité cellulaire est diminué par rapport au contrôle mais reste au-dessus de la limite admise de 80% de viabilité.

L'effet sur la viabilité cellulaire des PS-NH₂ est plus marqué lors de l'exposition en chronique par rapport à l'exposition aigue. En effet, à la concentration de 100 µg/mL, la viabilité cellulaire est autour de 75% lors de l'exposition aigue et autour de 13% lors de l'exposition chronique. L'exposition chronique de faible dose de PS-NH₂ semble donc avoir un impact plus important sur la viabilité cellulaire que l'exposition à cette même dose pendant 24h.

3.3. Stress oxydant

Les cellules ont été exposées à des doses de PS n'entraînant pas de cytotoxicité. Une cinétique sur 24h a été réalisée pour évaluer l'impact des nanoparticules sur la quantité intracellulaire de ROS. Les cellules ont été exposées aux PS-COOH de 500 nm ; 200 nm ; 100 nm et 50 nm, aux concentrations 12,5 µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL. Les PS-NH₂ de 50 nm ont également été testés

aux concentrations 3,125 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ et 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Ce test a été effectué sur le modèle de coculture non différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX et sur le modèle de coculture non différenciée de Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX.

Pour toutes les PS-COOH et à toutes les concentrations, les résultats suivent la même tendance. La Figure 16 montre les résultats, sur la coculture Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX, de l'exposition aux polystyrènes aux concentrations les plus élevées (50 $\mu\text{g/mL}$ pour les PS-COOH et 6,25 $\mu\text{g/mL}$ et 12,5 $\mu\text{g/mL}$ pour les PS-NH₂). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle. La fluorescence détectée, proportionnelle au contenu intracellulaire de ROS, ne varie pas par rapport au contrôle négatif. L'intégralité des résultats obtenus lors de l'exposition de la coculture non différenciée non mutées (Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX) aux PS-COOH et PH-NH₂ sont présentés en Annexe 3.

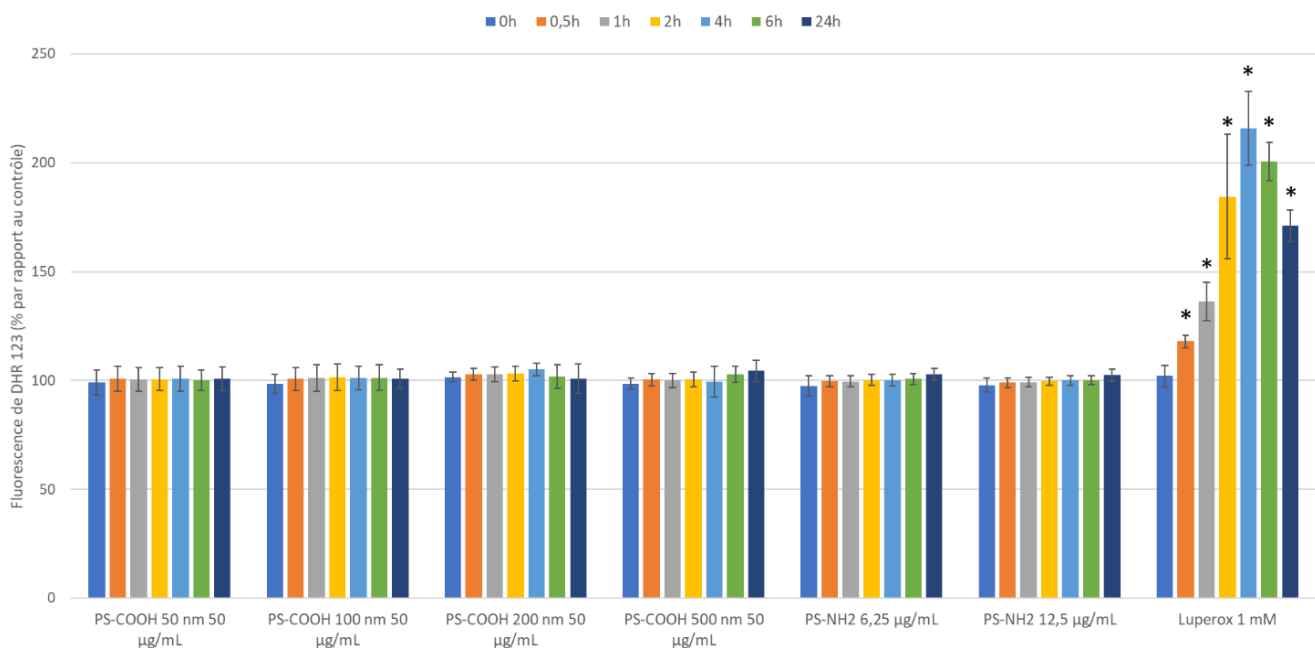


Figure 16 : Test DHR123 sur les cellules non différenciées en coculture Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX exposées aux PS-COOH et PS-NH₂.

PS-COOH de 50nm ; 100 nm ; 200 nm et 500 nm à la concentration 50 $\mu\text{g/mL}$ et PS-NH₂ 50 nm aux concentrations 6,25 $\mu\text{g/mL}$ et 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Mesures prises à T0h, T0,5h, T1h, T2h, T4h, T6h et T24h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle. Le luperox a servi de contrôle positif. Les valeurs moyennes \pm l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, exposés vs contrôle.

Ce modèle d'épithélium intestinal a également été exposé aux PS-NH₂ de 50 nm aux concentrations 3,125 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$ et 12,5 $\mu\text{g/mL}$, concentrations n'entraînant pas de mort cellulaire dans la co-culture WT. Les expériences ne mettent pas en évidence d'effet sur

le contenu de ROS dans les cellules. A l'inverse, le luperox, qui a servi de contrôle positif, entraîne une augmentation significative de la production de ROS dans les cellules dès 0,5 h d'exposition.

Ce test a été réalisé en parallèle sur une coculture de cellules Caco2-LV-Nod2^{1007fs} et HT29-MTX. Le test a été réalisé de la même façon que sur la coculture WT. Sur la Figure 17, il est observé que les PS-COOH à la plus forte concentration (50 µg/mL) n'induisent pas de hausse significative de l'accumulation de ROS dans les lignées cellulaires par rapport au contrôle négatif, même après 24h d'exposition aux nanoparticules de polystyrène, quelle que soit leur taille. Donc ces nanoparticules de polystyrène n'entraînent pas de stress oxydant dans les cellules. De même, l'exposition aux PS-NH₂ sur la coculture mutée n'entraîne pas de hausse significative de la fluorescence, donc de la production de ROS. La figure récapitulative du test de stress oxydant sur la coculture Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX est présentée en Annexe 4.

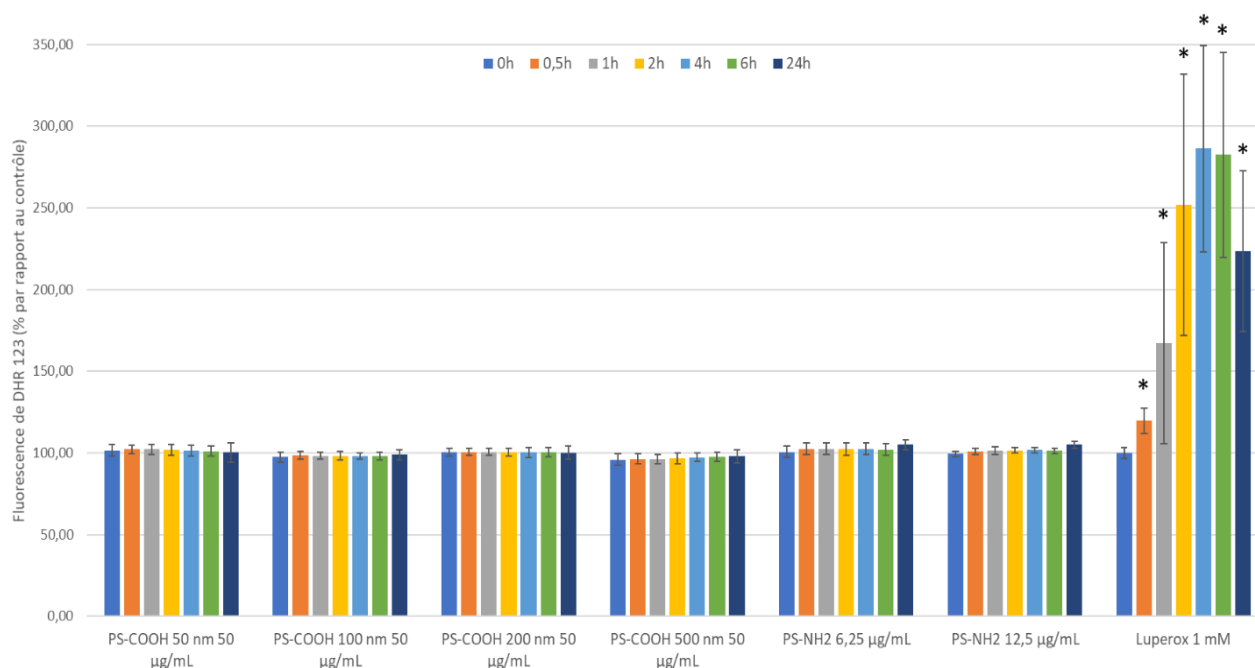


Figure 17 : Test DHR123 sur les cellules non différenciées en coculture Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX exposées aux PS-COOH et PS-NH₂.

PS-COOH de 50nm ; 100 nm ; 200 nm et 500 nm à la concentration 50 µg/mL et PS-NH₂ 50 nm aux concentrations 6,25 µg/mL et 12,5 µg/mL. Mesures prises à T0h, T0,5h, T1h, T2h, T4h, T6h et T24h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle. Le luperox a servi de contrôle positif. Les valeurs moyennes ± l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, exposés vs contrôle.

Les tests d'interférence avec les PS ont été réalisés afin de s'assurer que les résultats obtenus sont bien l'effet de l'action des PS sur les cellules. Le test réalisé avec les PS dans du milieu de

culture, sans cellule, montre que les PS n'émettent pas de fluorescence et ne diminuent pas la fluorescence du milieu de culture (Annexe 5). Le deuxième test d'interférence effectué avec les PS dans du milieu où 10% de réactif DHR123 dilué au 1:1000 a été rajouté a permis de s'assurer que les PS n'oxyde pas le DHR123 en rhodamine responsable de la fluorescence puisque la fluorescence n'est pas augmentée (Annexe 6).

3.4. Génotoxicité

3.4.1. Coculture non différenciée, exposition aigue

Les dommages oxydatifs à l'ADN peuvent être quantifiés à l'aide du test des comètes en condition alcaline qui met en évidence les cassures de brins d'ADN. Ce test de génotoxicité permet de rendre compte des effets délétères des nanoparticules de polystyrène sur l'ADN des cellules. Les résultats obtenus après une exposition de 24h aux PS-COOH de 500 nm ; 200 nm ; 100 nm et 50 nm aux concentrations 25 µg/mL ; 50 µg/mL sur la coculture de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX non différenciée ne montrent pas de différence significative avec le contrôle négatif (Figure 18). Ce test n'a pas mis en évidence de génotoxicité des PS-COOH. En revanche, une augmentation significative des dommages par rapport au contrôle a été mise en évidence avec l'exposition de la coculture non différenciée Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX aux PS-NH₂ à la concentration 3,125 µg/mL. Ce qui représente 1,80% d'ADN dans la queue de la comète pour l'exposition aux PS-NH₂ à 3,125 µg/mL, alors que dans le contrôle, le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète est de 0,51%. Ici, la différence est de très faible ampleur (comparée à la différence entre contrôle positif en contrôle négatif), ce qui pose la question de sa significativité biologique.

Le test des comètes a également été réalisé, dans les mêmes conditions, sur une coculture de cellules Caco2-LV-Nod2^{1007fs} et HT29-MTX (90/10). Les conditions testées avec les PS-COOH ne montrent pas d'augmentation des dommages à l'ADN par rapport au contrôle négatif. Le test ne met donc pas en évidence de génotoxicité des PS-COOH. D'autre part, sur ce modèle, aucune augmentation significative des dommages à l'ADN n'a été mis en évidence par rapport au contrôle négatif lors de l'exposition aux PS-NH₂ (Figure 18).

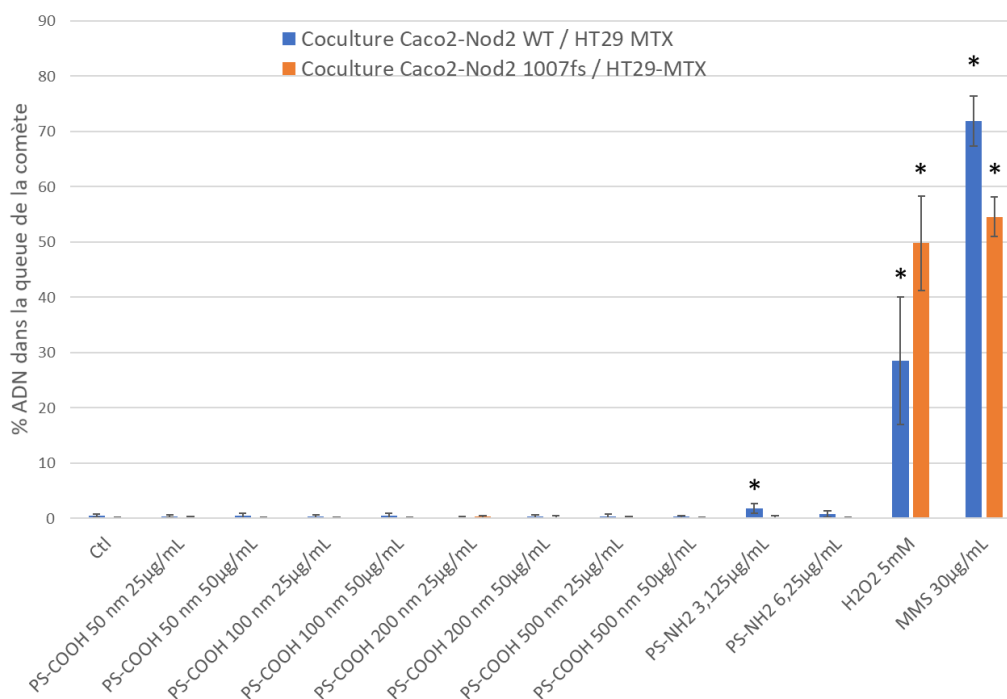


Figure 18 : Test des comètes réalisé sur coculture non différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et coculture de cellules Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX, après exposition à des PS-COOH et PS-NH₂. PS-COOH de 50 nm, 100 nm, 200 nm et 500 nm aux concentrations 25 µg/mL et 50 µg/mL et des PS-NH₂ de 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL et 6,25 µg/mL. Les comètes sont visualisées grâce au microscope à fluorescence et au logiciel Comet Assay IV. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ADN par rapport au contrôle. H₂O₂ à 5 mM et MMS à 30 µg/mL ont servi de contrôle positif. Les valeurs moyennes ± l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, exposés vs contrôle.

3.4.2. Génotoxicité sur coculture différenciée 17 jours, exposition aiguë et chronique

L'expérience a été réalisée sur coculture (WT et mutée) différenciée 17 jours et après exposition aiguë ou chronique aux PS. Les résultats sont similaires à ceux obtenus sur cellules non différenciées. Les PS-COOH n'entraînent pas de dommage à l'ADN sur les cellules exposées en aiguë et en chronique. De même, le test des comètes ne met pas en évidence de génotoxicité lors de l'exposition aiguë (Annexe 7) ou chronique (Annexe 8) aux PS-NH₂.

3.5. Inflammation

Puisque la maladie de Crohn est une maladie inflammatoire qui fait intervenir des facteurs environnementaux, nous nous sommes questionnés sur l'impact de particules de PS sur la sécrétion de médiateurs de l'inflammation par les cellules épithéliales intestinales.

Pour cela nous avons réalisé un test ELISA permettant de mettre en évidence l'interleukine 8 (IL-8). L'IL-8 est une chimiokine qui est produite lors de la détection d'un agent potentiellement pathogène et qui permet le recrutement des polynucléaires neutrophiles afin de mettre en place la phagocytose des éléments pathogènes. Elle est notamment produite par les cellules épithéliales.

Nous avons également réalisé le test ELISA afin de détecter l'interleukine 1 β (IL-1 β). L'interleukine 1 est une cytokine majeure de la réponse immunitaire innée puisqu'elle entraîne l'augmentation de l'expression de facteurs d'adhésion sur les cellules endothéliales afin de faciliter la migration des leucocytes sur le site de l'infection. Elle est principalement produite par les monocytes et les macrophages. Par conséquent, les résultats obtenus sur les cocultures de cellules épithéliales montrent qu'il n'y a pas la présence d'IL-1 β que ce soit dans les contrôles négatifs ou dans les cellules exposées aux PS. Les résultats ne sont pas présentés.

3.5.1. ELISA IL-8 sur coculture non différenciée, exposition aigue

Des cellules en cocultures WT et mutées, non différenciées, ont été exposées aux PS pour une durée de 24h. L'exposition à de l'IL-1 β ainsi qu'à du MDP (2 μ g/mL) + LPS (10 μ g/mL) ont servi de contrôles positifs puisque ces deux contrôles entraînent une augmentation significative de la sécrétion de l'IL-8 par les cellules exposées.

Les résultats montrent une diminution significative de la concentration en IL-8 dans le surnageant des cellules (aussi bien WT que mutées) ayant été exposés aux PS-NH₂. Les tests d'interférence réalisés ont permis de s'assurer que le résultat observé est dû à l'action des PS-NH₂ sur les cellules. Les PS-COOH n'entraînent pas de modification dans la concentration en IL-8 dans les surnageants des cellules (Figure 19).

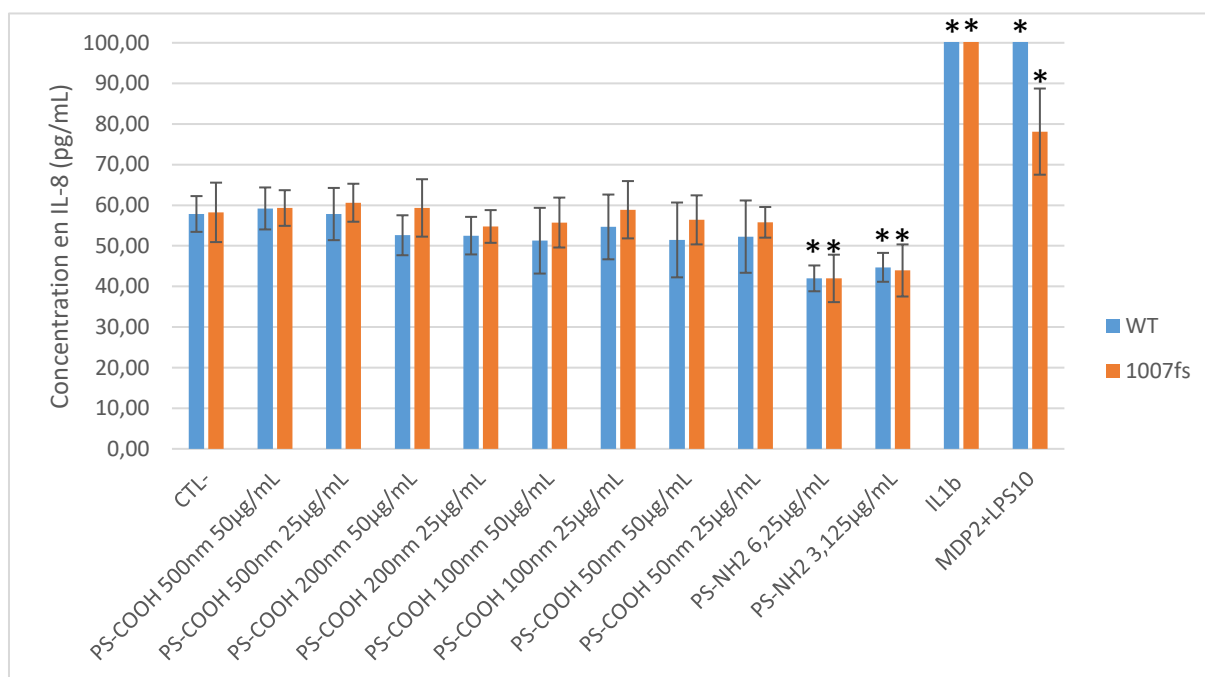


Figure 19 : Quantification des IL-8 par le test ELISA dans le surnageant des cellules en cocultures non différenciées exposées 24h aux PS-COOH et PS-NH₂.

PS-COOH de 500nm, 200nm, 100nm et 50nm aux concentrations 50µg/mL et 25 µg/mL et aux PS-NH₂ aux concentrations 6,25µg/mL et 3,125µg/mL. L'exposition à l'IL1b (10ng/mL) et aux MDP 2µg/mL + LPS 10µg/mL ont servi de contrôles positifs. Les valeurs moyennes ± l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, exposés vs contrôle.

3.5.2. ELISA IL-8 sur coculture différenciée

Des cellules en coculture (WT et mutées) différenciées 17 jours ont été exposées aux PS-COOH de 500nm et 50nm, aux concentrations 100µg/mL ; 50µg/ml et 25µg/mL ainsi qu'aux PS-NH₂ aux concentrations 12,5µg/mL ; 6,25µg/mL et 3,125µg/mL. L'exposition à 10ng/mL d'IL-1β a servi de contrôle positif. L'expérience a été réalisée en exposition aiguë (24h d'exposition) (Figure 20) et en exposition chronique (4 jours d'exposition) (Figure 21). Dans ces deux conditions, aucune variation par rapport au contrôle n'a été observée.

○ **Exposition aiguë**

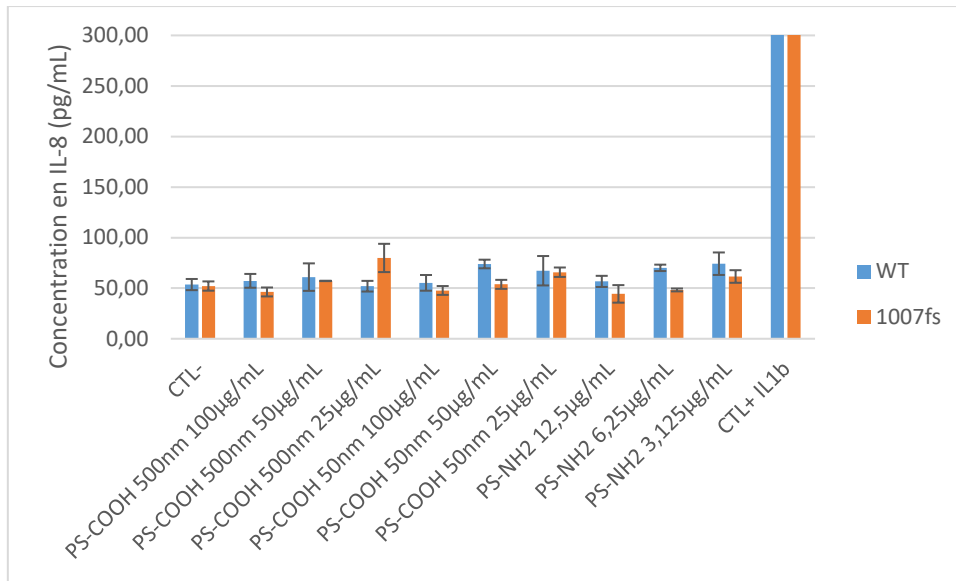


Figure 20 : Quantification des IL-8 par le test ELISA dans le surnageant des cellules en cocultures différenciées 17 jours, exposées 24h aux PS-COOH et PS-NH₂. PS-COOH de 500nm et 50nm aux concentrations 100µg/mL ; 50µg/mL et 25 µg/mL et aux PS-NH₂ aux concentrations 12,5µg/mL ; 6,25µg/mL et 3,125µg/mL. L'exposition à l'IL1b (10ng/mL) a servi de contrôle positif. Graphe généré à partir des moyennes ± l'écart type des 5 puits exposés par condition, l'expérience n'a été menée qu'une fois.

○ **Exposition chronique**

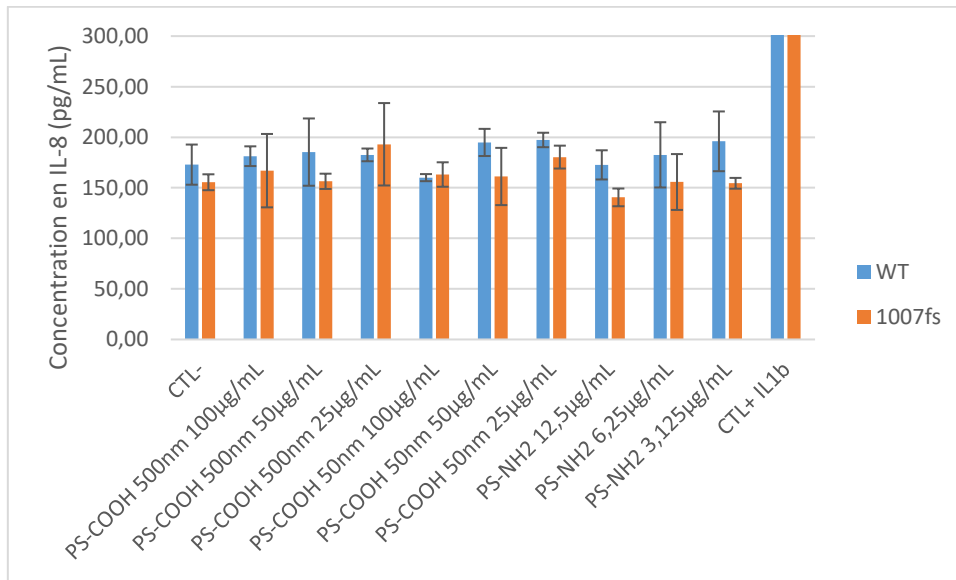


Figure 21 : Quantification des IL-8 par le test ELISA dans le surnageant des cellules en cocultures différenciées 17 jours, exposées 4 jours aux PS-COOH et PS-NH₂. PS-COOH de 500nm et 50nm aux concentrations 100µg/mL ; 50µg/mL et 25 µg/mL et aux PS-NH₂ aux concentrations 12,5µg/mL ; 6,25µg/mL et 3,125µg/mL. L'exposition à l'IL1b (10ng/mL) a servi de contrôle positif. Graphe généré à partir des moyennes ± l'écart type des 5 puits exposés par condition, l'expérience n'a été menée qu'une fois.

Les concentrations en IL-8 lors de l'exposition chronique aux PS sur les cellules différenciées sont environ trois fois supérieures par rapport à la condition aigue. Cependant la concentration d'IL-8 est également supérieure dans le contrôle négatif. Par conséquent, l'exposition chronique aux PS n'entraîne pas de hausse dans la production d'IL-8 par rapport aux cellules contrôles. Cette valeur plus élevée peut s'expliquer par le fait que les cellules ont été exposées après 17 jours en culture, il est donc probable qu'il y ait davantage de cellules dans le puit. D'autre part, la différenciation cellulaire modifiant le phénotype, il est possible que les cellules différenciées secrètent davantage d'IL-8 que les cellules non différenciées.

La diminution de la concentration en IL-8 lors de l'exposition aux PS-NH₂ des cellules non différenciées n'a pas été observée lors de l'exposition des cocultures différenciées.

4. Discussion

Le diagramme ci-dessous reprend l'ensemble des tests réalisés durant cette étude (Figure 22).

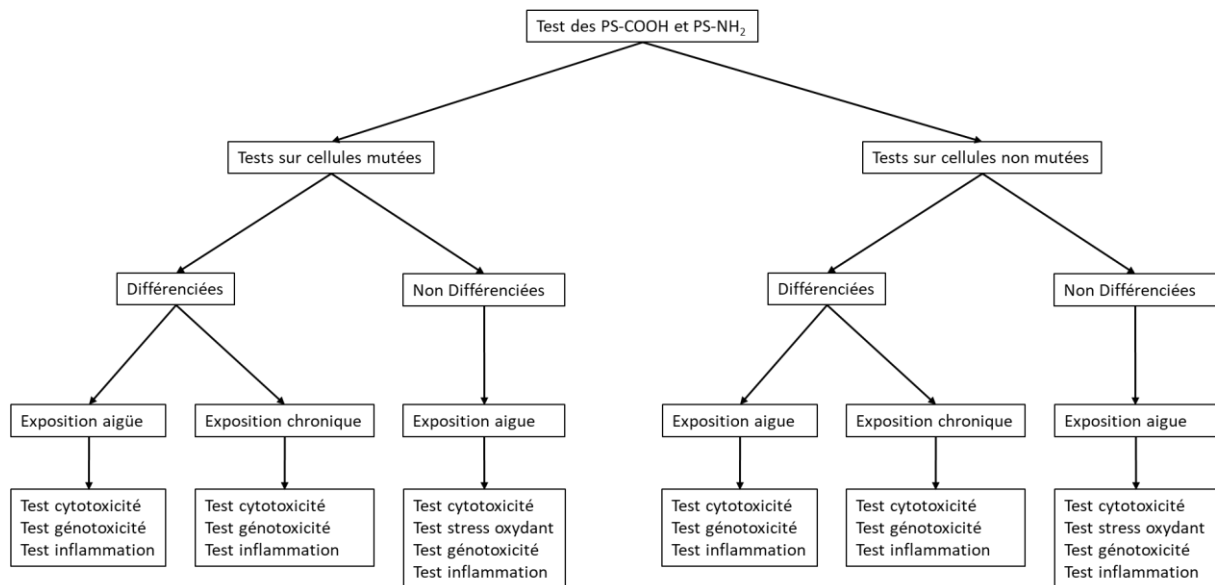


Figure 22 : Récapitulatif des tests réalisés dans cette étude.

4.1. Tests des PS-COOH sur cocultures d'épithélium intestinal humain muté et non muté

4.1.1. Cytotoxicité

Les tests WST-1 n'ont pas mis en évidence de cytotoxicité des nanoparticules de PS-COOH sur les différents modèles d'épithélium intestinal humain sain ou dont les cellules sont porteuses de la mutation 1007fs sur le gène Nod2, mutation associée à la maladie de Crohn. La baisse significative du métabolisme cellulaire observée à la concentration 100 µg/mL pour toutes les PS-COOH n'entraîne pas de baisse de la viabilité en dessous de 80%. L'effet cytotoxique est donc mineur, ce seuil étant communément admis comme étant compris dans les limites de variabilité de la méthode. De plus, cette concentration est très élevée et n'est pas représentative d'une exposition environnementale.

Aucune cytotoxicité n'a été mise en évidence sur les cellules en cocultures différenciées, même aux concentrations les plus élevées. Cela pourrait être expliqué par le fait que la densité

cellulaire après 17 jours permet une protection face aux éléments extérieurs. Aussi, lorsque les cellules Caco2 sont différenciées, elles présentent des microvillosités (31,32) du côté apical qui limitent l'endocytose des matériaux volumineux tels que les nanoparticules voire les agglomérats de NP puisque les microvillosités ont un rôle principalement dans l'absorption de petites molécules (ions, H₂O). Les cellules Caco2 possèdent également des jonctions serrées qui renforcent l'adhésion des cellules entre elles. De plus, les cellules HT29-MTX produisent une grande quantité de mucus qui protège l'épithélium (28). Enfin, du fait de leur plus grand nombre, chaque cellule a moins de place et donc la surface d'exposition est réduite. Domenech et al. ont obtenu des résultats similaires en exposant pendant 24h des cellules Caco2 non différenciées à des PS-COOH, puisque même à la concentration la plus élevée (200 µg/mL), la diminution du pourcentage de viabilité cellulaire n'est pas significative par rapport au contrôle (46). Un autre article a démontré que la viabilité des cellules en coculture différenciées Caco2 / HT-29 n'est pas impactée par l'exposition aux PS-COOH pendant 24h (47).

4.1.2. Stress oxydant

Le test utilisant le DHR123 a été utilisé pour mesurer la production de ROS dans les cellules et donc pour mettre en évidence un éventuel stress oxydant qui serait induit par les PS-COOH. Sur la coculture Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX, les nanoparticules de PS-COOH n'entraînent pas d'effet anti-oxydant ou pro-oxydant sur les cellules, les PS-COOH n'entraînent donc pas de stress oxydatif dans les cellules. Une conclusion similaire est faite pour l'exposition des PS-COOH sur les cellules Caco2-LV-Nod2 WT et HT29-MTX. Ces résultats sont en accord avec ceux de Domenech et al. qui n'ont pas trouvé de hausse significative de la production de ROS par les cellules Caco2 / HT-29 différenciées lors de l'exposition à plusieurs concentrations de PS-COOH (47).

4.1.3. Génotoxicité

Concernant la génotoxicité, notre étude est en accord avec la littérature (47) puisqu'aucune génotoxicité n'a été mise en évidence avec le test des comètes sur les modèles sains (WT) et mutés pour l'exposition aux PS-COOH.

4.1.4. Inflammation

L'exposition aux PS-COOH n'entraîne pas de hausse de la production d'interleukine-8, entre autres responsable de la mise en place des processus inflammatoires et de la réponse immunitaire. Rubio et al. ont testé les effets de l'exposition de PS-COOH sur plusieurs populations de cellules immunitaires et ainsi ont mis en évidence des différences de réponses parmi les lignées cellulaires. En effet, certaines lignées cellulaires ont montré une toxicité légère, une production de ROS et de la génotoxicité lors de l'exposition aux PS-COOH alors que d'autres lignées n'ont pas montré d'effet indésirable (48). Ces résultats mettent en évidence l'importance de la sélection des lignées cellulaires lors de l'évaluation des effets biologiques des NP-PS.

4.2. Tests des PS-NH₂ sur cocultures d'épithélium intestinal humain muté et non muté

4.2.1. Cytotoxicité

Lors du test de cytotoxicité, nous observons sur les deux types de cocultures non différenciées (muté et non muté) une diminution du métabolisme cellulaire avec l'augmentation de la concentration en PS-NH₂. Les PS-NH₂ sont connues pour leur potentiel cytotoxique (44). Cette diminution pourrait être expliquée par une baisse du nombre de cellules vivantes dans l'échantillon. En effet, les objets chargés positivement, comme les PS-NH₂ qui se retrouvent sous forme PS-NH³⁺ en solution, sont connus pour être toxiques pour les cellules (49). De plus, il a été démontré que les PS-NH₂ sont internalisées dans les cellules et sont stockées dans les lysosomes où elles s'accumulent (45,50) ce qui entraîne une augmentation du volume des lysosomes et une rupture lysosomale entraînant la libération du contenu lysosomal dans le cytosol. Il est alors observé une augmentation de la production de ROS intracellulaire et l'accumulation d'autophagosomes. Plusieurs événements pro-apoptotiques se succèdent jusqu'à un point de non-retour de mort cellulaire (45).

Nous observons une diminution de la viabilité cellulaire avec les PS-NH₂ que nous ne retrouvons pas avec les PS-COOH. La fonctionnalisation des billes de polystyrène et par

conséquent la charge à la surface des billes semble avoir un rôle dans la toxicité des particules sur les cellules de l'épithélium de l'intestin humain.

Le test WST-1 a permis de mettre en évidence une différence de sensibilité entre la coculture WT et la coculture porteuse du gène muté, avec une diminution plus importante du métabolisme cellulaire observée sur la coculture mutée après une exposition aux PS-NH₂.

Lors de l'exposition chronique des cocultures différenciées 17 jours, il est observé aux concentrations les plus élevées (100 µg/mL et 200 µg/mL) en PS-NH₂ que la viabilité cellulaire est largement diminuée par rapport à une exposition aiguë. L'exposition des cellules épithéliales intestinales à des polystyrènes, sur le long terme, pourrait donc être délétère aux cellules. Il pourrait y avoir davantage d'accumulation des PS-NH₂ lors d'expositions chroniques et cette exposition sur plusieurs jours pourrait amoindrir les défenses des cellules. Par ailleurs, la différence observée entre coculture mutée et non mutée n'est plus observable lors du test sur coculture différenciée.

Puisque les PS-NH₂ ont un effet cytotoxique, nous avons cherché à comprendre par quel mécanisme d'action elles exercent leur effet toxique. Pour cela, nous avons évalué leur impact sur la balance oxydative de la cellule, nous nous sommes intéressés à la production de médiateurs de l'inflammation et nous avons évalué les effets génotoxiques potentiels.

4.2.2. Stress oxydant

La réalisation du test DHR123 mesurant le stress oxydant n'a pas mis en évidence de changements significatifs de la production de ROS avec les PS-NH₂ sur la coculture Caco2-LV-Nod2^{1007fs} ni sur la coculture non mutée WT. Le stress oxydant ne semble pas être un mécanisme par lequel les PS-NH₂ exercent leurs effets toxiques. Ceci est étonnant, parce qu'en revanche, le test des comètes a mis en évidence une augmentation significative des cassures de l'ADN lors de l'exposition à 3,125 µg/mL de PS-NH₂ aux cellules de la coculture non mutée. Or, les dommages mis en évidence par le test des comètes sont des lésions oxydatives de l'ADN (cassures simple ou double brin de l'ADN, sites alkali-labiles tels que des sites abasiques). Il serait judicieux de mettre en œuvre d'autres tests en vue d'identifier un potentiel stress oxydant cellulaire. Le stress oxydant étant une altération de la balance entre production d'espèces oxydantes et élimination de ces dernières par les systèmes antioxydants cellulaires (systèmes

enzymatiques ou moléculaires), il serait intéressant de rechercher d'éventuelles pertes d'activité des systèmes antioxydants. D'autre part, le test DHR123 ne détecte que certaines espèces réactives de l'oxygène (les ions superoxydes), d'autres, non détectées, sont peut-être produites et responsables des effets cellulaires observés. Le stress oxydatif est l'un des mécanismes mis en évidence par lequel les NP-PS pourraient causer des dommages cellulaires (18). Lors de l'étude de l'impact de NP-PS sur l'épithélium alvéolaire, il a été démontré qu'une même NP-PS peut avoir des effets différents en fonction du type cellulaire. En effet, les PS-COOH entraînent la production de ROS dans 2 des 3 types de cellules étudiées (51). De plus, les PS-NH₂ entraînent sur ces mêmes lignées cellulaires une augmentation de la mort cellulaire induisant un stress oxydatif accru, accompagnée de marqueur indiquant la mort cellulaire apoptotique. Ils ont pu également mettre en évidence l'augmentation des ROS par la réalisation de 2 tests afin de couvrir l'ensemble du spectre des ROS (51).

4.2.3. Génotoxicité

Il n'a pas été mis en évidence de hausse dans la quantification des dommages à l'ADN sur le modèle d'épithélium intestinal porteur de la mutation sur le gène Nod2. Les faibles variabilités observées pourraient être causées par des additifs présents dans les billes de polystyrène. Cependant, la liste des additifs n'est pas fournie par le fabricant.

Il serait judicieux de confirmer cette hypothèse par la réalisation d'autres tests de génotoxicité, comme des tests de quantification des cassures double brin de l'ADN, qui sont elles aussi des lésions oxydatives de l'ADN. Par exemple il pourrait être envisagé de quantifier ces cassures via l'immunomarquage de 53BP1, qui est une protéine de réparation de l'ADN qui se fixe sur les sites de cassures et y forme des foci qui peuvent alors être comptés. Ce test permettrait d'identifier plus précisément le type de dommage causé par les particules de PS, puisqu'il détecte spécifiquement les cassures double brin.

4.2.4. Inflammation

Le test ELISA permettant de quantifier la sécrétion d'IL-8 a montré une diminution de la concentration en IL-8 dans le surnageant des cellules non différenciées exposées. Il est toutefois important de rappeler qu'à la concentration 6,25 µg/mL, les PS-NH₂ sont cytotoxiques pour les

cocultures mutées. La diminution de la quantité d'IL-8 pourrait être expliquée par la baisse de viabilité cellulaire. Cette diminution n'est pas observée sur les cellules différenciées car il n'y a pas de cytotoxicité à cette concentration. Des résultats différents ont été trouvés lorsque des cellules d'épithélium alvéolaire et des macrophages ont été exposés aux PS-NH₂ puisque les PS-NH₂ ont induit un niveau plus élevé de libération d'IL-8 par rapport aux PS-COOH (51).

4.3. Différences entre PS-COOH et PS-NH₂

Nous avons mis en évidence une différence de toxicité entre les PS-COOH et les PS-NH₂. Une hypothèse serait que la charge à la surface des billes permet ou non leur passage à travers les membranes cellulaires et seraient donc plus ou moins internalisées. Dans le milieu, les PS-COOH se trouvent sous forme PS-COO⁻ et les PS-NH₂ sous forme PS-NH₃⁺. Les membranes cellulaires étant chargées négativement, les PS-NH₂ pourraient plus facilement traverser la membrane cellulaire. De plus, les particules de taille inférieure à 150 nm peuvent traverser la barrière intestinale (17,18). Les PS-NH₂, de taille 50 nm, sont donc assez petites pour passer au travers du tractus gastro-intestinal. Cependant cette hypothèse ne semble pas être à retenir. En effet, nous avons réalisé des premières images en imagerie confocale sur des cellules non différenciées exposées aux NP. Celles-ci montrent que les deux types de NP-PS s'accumulent dans les cellules, a priori dans la voie endo-lysosomale. Ces premiers résultats sont en accord avec la littérature qui a déjà démontré que les nanoparticules de polystyrène, bien qu'étant chargées dans l'eau (positivement pour les PS-NH₂ et négativement pour les PS-COOH), sont recouvertes de protéines et de biomolécules une fois exposées dans un environnement biologique (milieu de culture) (51). Les complexes corona-nanoparticules qui en résultent, généralement proches de la neutralité ou légèrement négatifs en raison des protéines adsorbées, sont ensuite absorbés par la cellule, où ils s'accumulent dans les lysosomes (45,50,52,53).

Par conséquent, la toxicité des PS-NH₂ n'est pas due à l'internalisation des PS dans les cellules, mais impliquerait d'autres processus et les PS-COOH s'accumuleraient dans les cellules sans être toxiques. La couronne de protéines autour des PS-NH₂ pourrait alors être dégradée une fois internalisée dans les lysosomes, et ce phénomène s'accompagnerait d'un gonflement des lysosomes et d'une rupture lysosomale, entraînant la libération du contenu lysosomal dans le cytosol (45). Cela pourrait augmenter la possibilité d'une interaction directe entre les PS-NH₂ et les organites cellulaires, entraînant la mort cellulaire par apoptose (51). En revanche, lors de

l'exposition aux PS-COOH, Fröhlich et al. rapportent une altération de l'activité enzymatique lysosomale sans causer aucun gonflement ni perturbation lysosomale (53). De tels processus pourraient expliquer les différences de cytotoxicité du polystyrène, cationique et anionique. Ainsi, la perturbation lysosomale et la libération d'enzymes lysosomales pourraient contribuer à la mort cellulaire induite par les PS-NH₂, car il a été démontré que ces enzymes activent les voies de mort cellulaire apoptotique (51).

Les études d'accumulation chez les mammifères manquent. La première étude à avoir fait ces recherches fait part d'une bioaccumulation qui s'accroît au fil du temps, dans le foie, les reins et les intestins des souris ayant été exposées à des microparticules de polystyrène de 5 à 20 µm (54). De plus, l'étude publiée récemment par Liang et al. met en évidence une toxicité combinée des micro- et nano-particules de polystyrène entraînant un dysfonctionnement de la barrière intestinale sur des souris exposées. Ce dysfonctionnement est dû à l'apoptose des cellules épithéliales médiée par les ROS (55).

4.4. Analyse critique et perspectives

Les nanoparticules de polystyrène fonctionnalisées avec un groupement carboxyle n'ont montré que peu d'effets toxiques, que ce soit sur les cellules en coculture WT ou mutées. Les particules de plastiques peuvent adsorber des contaminants à leur surface comme des pesticides ou encore des métaux (56) et une vaste gamme d'additifs sont utilisés dans la formulation des plastiques comme les phtalates, bisphénols, époxydes. Or, pour une grande partie d'entre eux, des effets néfastes sur la santé ont été mis en avant (57). Par conséquent, il serait pertinent de tester des particules de plastiques vieillis ou ayant adsorbé des polluants. Aussi, les tests sur les organoïdes d'intestin *in vitro* permettraient d'avoir une meilleure représentativité des effets des particules sur l'épithélium intestinal.

4.4.1. Alternative aux cultures en 2 dimensions : les organoïdes

Les expérimentations de toxicologie utilisent encore beaucoup les modèles animaux pour réaliser des expériences *in vivo*. Ces modèles animaux permettent d'avoir une bonne représentativité et des modèles plus fiables par rapport aux essais *in vitro*, qui sont, par définition, plus simplifiés. Cependant, du fait de la prise de conscience de la nécessité de réduire

le nombre d'animaux de laboratoire utilisés lors des expérimentations, des approches alternatives sont développées. Les organoïdes en sont un exemple puisque ces modèles *in vitro* en trois dimensions permettront de pallier le manque de représentativité des modèles *in vitro* en deux dimensions. Les organoïdes sont des modèles complexes dont la structure, l'organisation et l'anatomie se rapprochent de l'organe dont ils dérivent. Un modèle d'organoïde d'intestin *in vitro*, en trois dimensions (3D), de type minigut (58) pourrait être mis en place pour évaluer *in vitro* les effets toxiques de nanoparticules de polystyrène. Les organoïdes gastro-intestinaux sont constitués d'un épithélium qui a la capacité de s'auto-organiser.

L'épithélium intestinal est un tissu ordonné en cryptes et villosités à renouvellement rapide, ce qui est rendu possible par la présence de cellules souches pluripotentes dans le fond des cryptes de l'intestin. Ces cellules se divisent dans le fond des cryptes, donnant naissance à des cellules filles qui migrent tout en se différenciant le long des villosités, et sont éliminées par apoptose aux extrémités des villosités. Les cellules souches auto-renouvelables situées au niveau du fond des cryptes, vont produire des cellules amplificatrices de transit (TA) à prolifération rapide. C'est à partir de ces cellules souches pluripotentes que tous les types cellulaires de l'épithélium de l'intestin sont produits. Les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules entéro-endocrines se développent à partir des cellules TA et continuent leur migration le long de l'axe crypte-villus. Le quatrième type de cellules différenciées majeur, la cellule de Paneth, réside au fond de la crypte (59).

Les organoïdes d'épithélium intestinaux peuvent être formés à partir de plusieurs méthodes. L'une d'elles consiste à prélever des cryptes dans l'intestin grêle de souris adultes. Une fois isolées, ces cryptes intestinales contenant des cellules souches doivent être placées dans une boîte de culture cellulaire avec un milieu de culture spécifique appelé matrigel, dans lequel sont ajoutés des facteurs de différenciation, jusqu'à leur complète différenciation en miniguts. Le matrigel est utilisé comme substitut *ex vivo* à la matrice extracellulaire(60).

Lorsque les conditions de culture le permettent, *in vitro*, les cryptes vont subir plusieurs remaniements, notamment la partie ouverte de la crypte qui va se refermer. Par la suite, la crypte va subir des phénomènes de bourgeonnements, ce qui va mener à la formation de sphéroïdes, c'est-à-dire de structures fermées composées de domaines épithéliaux de type villosités dans lesquels tous les types de cellules différenciées sont présents (59).

Le centre de l'organoïde correspond au lumen de l'intestin, par conséquent, pour exposer les organoïdes aux nanoplastiques de polystyrène, des micro-injections doivent être réalisées pour reproduire le phénomène d'absorption intestinale. Ainsi, puisque tous les types cellulaires sont présents au sein de l'organoïde, il est alors possible de voir l'impact et le devenir de particules qui seraient internalisées.

4.4.2. Exposition aux nanoparticules et maladie de Crohn

Les PS-NH₂, dont la cytotoxicité a été démontrée, ont permis de mettre en évidence une différence de sensibilité entre les cocultures non mutées et mutées. La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui est favorisée par des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et un dysfonctionnement du système immunitaire. Les nanoparticules représentent donc un facteur environnemental qui pourrait avoir un impact sur le déclenchement ou l'aggravation de la maladie de Crohn. Il resterait à évaluer si d'autres mécanismes entraînant l'inflammation pourraient être mis en jeu lors de l'exposition de ces cellules porteuses d'un gène de prédisposition à la maladie de Crohn à des toxiques environnementaux. Puisque le principal symptôme de cette maladie est une inflammation, il serait intéressant de tester la réponse du système immunitaire après une exposition aux nanoparticules de polystyrène. Des tests sur des modèles 3D de cultures alliant cellules épithéliales et cellules immunitaires ont été réalisés et permettraient de rendre compte de tels effets (61).

5. Conclusion

Les résultats à l'issue de cette étude et qui feront l'objet d'un article, ont permis d'avoir une idée de la toxicité de nanoparticules de polystyrène fonctionnalisées avec différents groupements (-COOH et -NH₂) sur deux modèles d'épithélium intestinal humain. Les tests réalisés pendant cette étude n'ont pas mis en évidence d'effet particulier sur les cellules mutées avec le gène NOD2 associé à la maladie de Crohn, comparé aux cellules non mutées, toutefois, du fait de l'augmentation de la prévalence de la maladie dans la population générale, l'évaluation d'un tel impact devrait être poursuivie. De nombreux essais de toxicologie pourraient encore être réalisés afin de mieux connaître les effets des micro- et nano-plastiques sur la santé humaine. Les PS-COOH sont généralement caractérisées par une absorption cellulaire importante et des effets toxiques faibles ou inexistantes (47,62). En effet, même si les effets cellulaires des PS-COOH ne sont pas aussi évidents que, par exemple, la mort cellulaire et l'inhibition de la prolifération, la biopersistance et l'accumulation de PS-COOH pourraient interférer avec la fonction physiologique des cellules et des organes. L'adsorption de divers contaminants environnementaux par les NP-PS dont la toxicité a été démontrée, comme les métaux lourds (63) ou les polluants organiques persistants (POP) (64) pourrait intensifier leur bioaccumulation et leur toxicité (65). Par conséquent, le risque toxicologique réel des PS-COOH pourrait être associé à leur rôle potentiel en tant que porteurs de différents polluants environnementaux (46). Toutefois, l'ingestion ne constitue qu'une partie de l'apport humain potentiel en NP. Du fait de l'omniprésence des NP, de multiples sources et voies d'exposition sont prévisibles, dont l'inhalation en raison de la présence de NP dans l'air des zones urbaines (66). Aussi, peu d'études se sont intéressées à l'accumulation des NP chez les mammifères. Or, avec l'émergence des nanotechnologies et des nanomédecines il est primordial de comprendre les mécanismes d'actions et d'évaluer les risques pour la santé humaine.

6. Références bibliographiques

1. PlasticsEurope. Plastics - the Facts 2020 [Internet] [Internet]. 2020. Disponible sur: https://www.plasticseurope.org/application/files/3416/2270/7211/Plastics_the_facts-WEB-2020_versionJun21_final.pdf
2. Lehner R, Weder C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environ Sci Technol*. 19 févr 2019;53(4):1748-65.
3. Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, Barlaz M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Phil Trans R Soc B*. 27 juill 2009;364(1526):1985-98.
4. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv*. juill 2017;3(7):e1700782.
5. Cózar A, Echevarría F, González-Gordillo JI, Irigoien X, Ubeda B, Hernández-León S, et al. Plastic debris in the open ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 juill 2014;111(28):10239-44.
6. Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*. 13 févr 2015;347(6223):768-71.
7. Wagner M, Scherer C, Alvarez-Muñoz D, Brennholt N, Bourrain X, Buchinger S, et al. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ Sci Eur*. 2014;26(1):12.
8. Eubeler JP, Bernhard M, Knepper TP. Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 janv 2010;29(1):84-100.
9. da Costa JP, Santos PSM, Duarte AC, Rocha-Santos T. (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Sci Total Environ*. 1 oct 2016;566-567:15-26.
10. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFS2 [Internet]*. juin 2016 [cité 23 août 2021];14(6). Disponible sur: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2016.4501>
11. Toussaint B, Raffael B, Angers-Loustau A, Gilliland D, Kestens V, Petrillo M, et al. Review of micro- and nanoplastic contamination in the food chain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. mai 2019;36(5):639-73.
12. Boczkowski J, Hoet P. What's new in nanotoxicology? Implications for public health from a brief review of the 2008 literature. *Nanotoxicology*. mars 2010;4(1):1-14.
13. Forte M, Iachetta G, Tussellino M, Carotenuto R, Prisco M, De Falco M, et al. Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro*. mars 2016;31:126-36.
14. Danopoulos E, Jenner LC, Twiddy M, Rotchell JM. Microplastic Contamination of Seafood Intended for Human Consumption: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect*. déc 2020;128(12):126002.

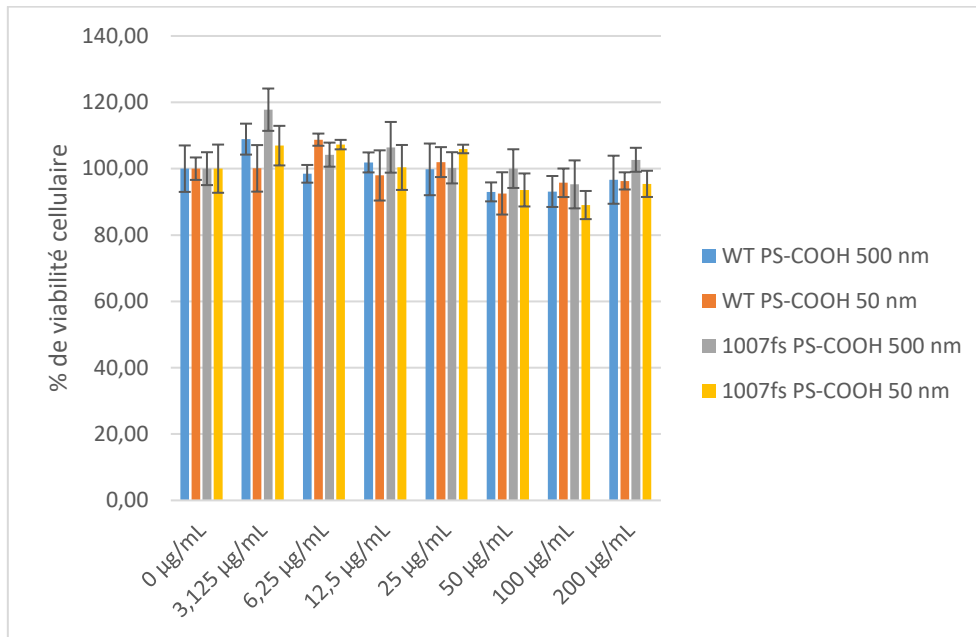
15. Danopoulos E, Twiddy M, Rotchell JM. Microplastic contamination of drinking water: A systematic review. Mukherjee A, éditeur. PLoS ONE. 31 juill 2020;15(7):e0236838.
16. Schwabl P, Köppel S, Königshofer P, Bucsics T, Trauner M, Reiberger T, et al. Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case Series. *Ann Intern Med*. 1 oct 2019;171(7):453.
17. Walczak AP, Kramer E, Hendriksen PJM, Tromp P, Helsper JPF, van der Zande M, et al. Translocation of differently sized and charged polystyrene nanoparticles in in vitro intestinal cell models of increasing complexity. *Nanotoxicology*. mai 2015;9(4):453-61.
18. Wright SL, Kelly FJ. Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environ Sci Technol*. 20 juin 2017;51(12):6634-47.
19. Wu T, Tang M. Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. *J Appl Toxicol*. janv 2018;38(1):25-40.
20. Senathirajah K, Attwood S, Bhagwat G, Carbery M, Wilson S, Palanisami T. Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*. févr 2021;404:124004.
21. Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martínez-Augustin O. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm Bowel Dis*. déc 2014;20(12):2394-404.
22. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. nov 2009;9(11):799-809.
23. Maladie de Crohn - symptômes, causes, traitements et prévention [Internet]. VIDAL. [cité 23 août 2021]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/maladies/estomac-intestins/maladie-crohn.html>
24. VIDAL - Crohn (maladie de) - La maladie [Internet]. [cité 4 juin 2020]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/recommandations/3751/crohn_maladie_de/la_maladie/
25. Adler J, Rangwalla SC, Dwamena BA, Higgins PD. The Prognostic Power of the NOD2 Genotype for Complicated Crohn's Disease: A Meta-Analysis. *American Journal of Gastroenterology*. avr 2011;106(4):699-712.
26. Carneiro LAM, Travassos LH. The Interplay between NLRs and Autophagy in Immunity and Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. 2013 [cité 23 août 2021];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00361/abstract>
27. Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci*. janv 2000;89(1):63-75.
28. Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res*. 1 oct 1990;50(19):6334-43.
29. Pontier C, Pachot J, Botham R, Lenfant B, Arnaud P. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J Pharm Sci*. oct 2001;90(10):1608-19.

30. Walter E, Janich S, Roessler BJ, Hilfinger JM, Amidon GL. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: in vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *J Pharm Sci.* oct 1996;85(10):1070-6.
31. Quaroni A, Hochman J. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. *Advanced Drug Delivery Reviews.* nov 1996;22(1-2):3-52.
32. Sambruy Y, Ferruzza S, Ranaldi G, De Angelis I. Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology. *Cell Biology and Toxicology.* 2001;17(4):301-17.
33. Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* 1 oct 1990;50(19):6334-43.
34. Araújo F, Sarmiento B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. *International Journal of Pharmaceutics.* déc 2013;458(1):128-34.
35. Guadagnini R, Halamoda Kenzaoui B, Walker L, Pojana G, Magdolenova Z, Bilanicova D, et al. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology.* mai 2015;9 Suppl 1:13-24.
36. Raymond Tice, Vasquez M. PROTOCOL FOR THE APPLICATION OF THE pH>13 ALKALINE SINGLE CELL GEL (SCG) ASSAY TO THE DETECTION OF DNA DAMAGE IN MAMMALIAN CELLS. 1999.
37. Genies C. Génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques en melanges, une classe majeure de polluants atmosphériques. *Médecine humaine et pathologie.* Université de Grenoble; 2013.
38. Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, et al. Synergistic Effect of Muramyl dipeptide with Lipopolysaccharide or Lipoteichoic Acid To Induce Inflammatory Cytokines in Human Monocytic Cells in Culture. *Clements JD, éditeur. Infect Immun.* avr 2001;69(4):2045-53.
39. Takada H, Yokoyama S, Yang S. Enhancement of endotoxin activity by muramyl dipeptide. *Journal of Endotoxin Research.* 1 oct 2002;8(5):337-42.
40. Li J. Regulation of IL-8 and IL-1 expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Human Molecular Genetics.* 15 juin 2004;13(16):1715-25.
41. Philpott DJ, Viala J. Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* juin 2004;18(3):555-68.
42. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, et al. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *The Lancet.* mai 2005;365(9473):1794-6.
43. Fröhlich E, Roblegg E. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology.* 27 janv 2012;291(1-3):10-7.
44. Anguissola S, Garry D, Salvati A, O'Brien PJ, Dawson KA. High Content Analysis Provides Mechanistic Insights on the Pathways of Toxicity Induced by Amine-Modified Polystyrene Nanoparticles. *Hussain S, éditeur. PLoS ONE.* 19 sept 2014;9(9):e108025.

45. Wang F, Bexiga MG, Anguissola S, Boya P, Simpson JC, Salvati A, et al. Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Nanoscale*. 2013;5(22):10868.
46. Domenech J, Cortés C, Vela L, Marcos R, Hernández A. Polystyrene Nanoplastics as Carriers of Metals. Interactions of Polystyrene Nanoparticles with Silver Nanoparticles and Silver Nitrate, and Their Effects on Human Intestinal Caco-2 Cells. *Biomolecules*. 9 juin 2021;11(6):859.
47. Domenech J, Hernández A, Rubio L, Marcos R, Cortés C. Interactions of polystyrene nanoplastics with in vitro models of the human intestinal barrier. *Arch Toxicol*. sept 2020;94(9):2997-3012.
48. Rubio L, Barguilla I, Domenech J, Marcos R, Hernández A. Biological effects, including oxidative stress and genotoxic damage, of polystyrene nanoparticles in different human hematopoietic cell lines. *Journal of Hazardous Materials*. nov 2020;398:122900.
49. Ruenraroengsak P, Novak P, Berhanu D, Thorley AJ, Valsami-Jones E, Gorelik J, et al. Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles. *Nanotoxicology*. févr 2012;6(1):94-108.
50. Bexiga MG, Varela JA, Wang F, Fenaroli F, Salvati A, Lynch I, et al. Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7- and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line. *Nanotoxicology*. déc 2011;5(4):557-67.
51. Ruenraroengsak P, Tetley TD. Differential bioreactivity of neutral, cationic and anionic polystyrene nanoparticles with cells from the human alveolar compartment: robust response of alveolar type 1 epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*. déc 2015;12(1):19.
52. Wang F, Salvati A, Boya P. Lysosome-dependent cell death and deregulated autophagy induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Open Biol*. avr 2018;8(4):170271.
53. Fröhlich E, Meindl C, Roblegg E, Ebner B, Absenger M, Pieber TR. Action of polystyrene nanoparticles of different sizes on lysosomal function and integrity. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9(1):26.
54. Deng Y, Zhang Y, Lemos B, Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci Rep*. mai 2017;7(1):46687.
55. Liang B, Zhong Y, Huang Y, Lin X, Liu J, Lin L, et al. Underestimated health risks: polystyrene micro- and nanoplastics jointly induce intestinal barrier dysfunction by ROS-mediated epithelial cell apoptosis. *Part Fibre Toxicol*. déc 2021;18(1):20.
56. Tang Y, Rong J, Guan X, Zha S, Shi W, Han Y, et al. Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. *Environ Pollut*. mars 2020;258:113845.
57. Ballesteros V, Costa O, Iñiguez C, Fletcher T, Ballester F, Lopez-Espinosa M-J. Exposure to perfluoroalkyl substances and thyroid function in pregnant women and children: A systematic review of epidemiologic studies. *Environment International*. févr 2017;99:15-28.
58. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*. 18 déc 2014;516(7531):400-4.

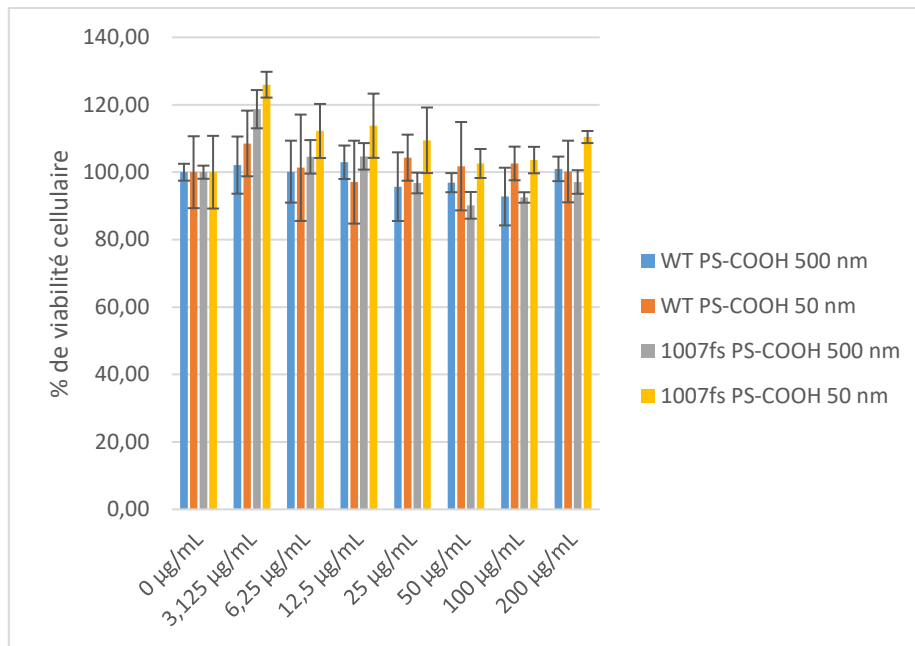
59. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 14 mai 2009;459(7244):262-5.
60. Kretzschmar K, Clevers H. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Developmental Cell*. sept 2016;38(6):590-600.
61. Lehner R, Wohlleben W, Septiadi D, Landsiedel R, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. A novel 3D intestine barrier model to study the immune response upon exposure to microplastics. *Arch Toxicol*. juill 2020;94(7):2463-79.
62. Cortés C, Domenech J, Salazar M, Pastor S, Marcos R, Hernández A. Nanoplastics as a potential environmental health factor: effects of polystyrene nanoparticles on human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environ Sci: Nano*. 2020;7(1):272-85.
63. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: Luch A, éditeur. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* [Internet]. Basel: Springer Basel; 2012 [cité 23 août 2021]. p. 133-64. (Experientia Supplementum; vol. 101). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
64. Guo W, Pan B, Sakkiah S, Yavas G, Ge W, Zou W, et al. Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods. *IJERPH*. 8 nov 2019;16(22):4361.
65. Wang Y-L, Lee Y-H, Chiu I-J, Lin Y-F, Chiu H-W. Potent Impact of Plastic Nanomaterials and Micromaterials on the Food Chain and Human Health. *IJMS*. 3 mars 2020;21(5):1727.
66. Prata JC. Airborne microplastics: Consequences to human health? *Environmental Pollution*. mars 2018;234:115-26.

7. Annexes



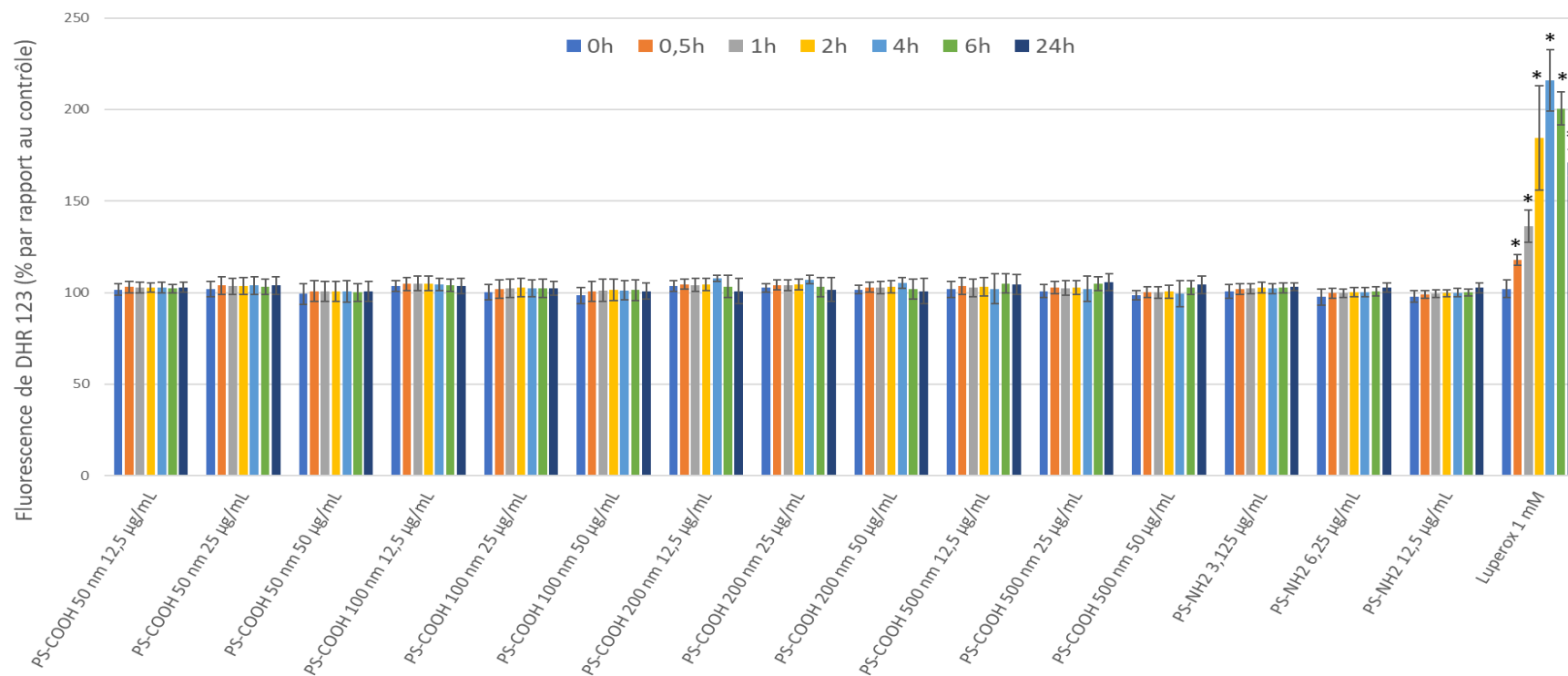
Annexe 1 : Essais de cytotoxicité sur cocultures différenciées 17 jours Caco2-WT/HT29-MTX et Caco2-1007fs/HT29-MTX ; exposition aiguë aux PS-COOH 500 nm et 50 nm.

Concentrations en PS-COOH : 0 µg/mL ; 3,125 µg/mL ; 6,25 µg/mL ; 12,5 µg/mL ; 25 µg/mL ; 50 µg/mL ; 100 µg/mL ; 200 µg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Graphe généré à partir des moyennes ± l'écart type des 5 puits exposés par condition, l'expérience n'a été menée qu'une fois.



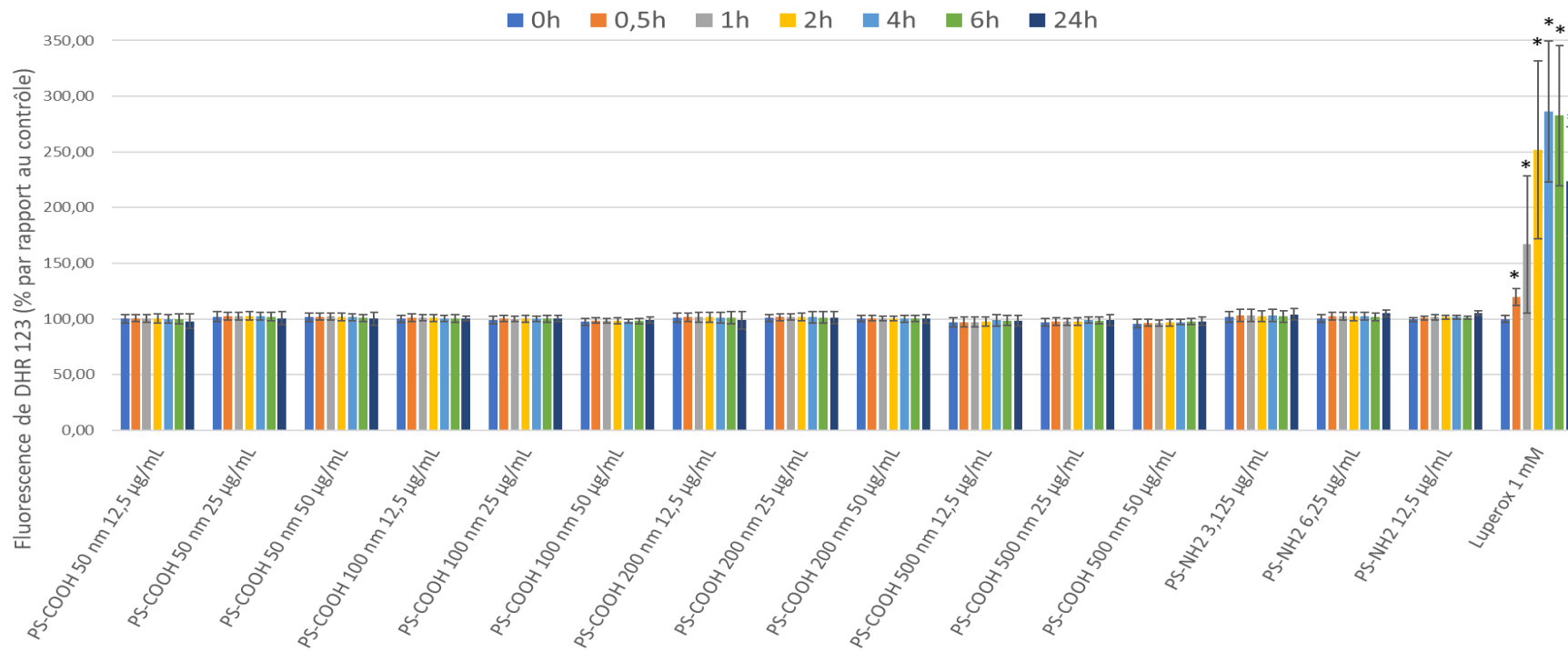
Annexe 2 : Essais de cytotoxicité sur cocultures différenciées 17 jours Caco2-WT/HT29-MTX et Caco2-1007fs/HT29-MTX ; exposition répétée aux PS-COOH 500 nm et 50 nm.

Concentrations en PS-COOH : 0 µg/mL ; 3,125 µg/mL ; 6,25 µg/mL ; 12,5 µg/mL ; 25 µg/mL ; 50 µg/mL ; 100 µg/mL ; 200 µg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Graphe généré à partir des moyennes \pm l'écart type des 5 puits exposés par condition, l'expérience n'a été menée qu'une fois.



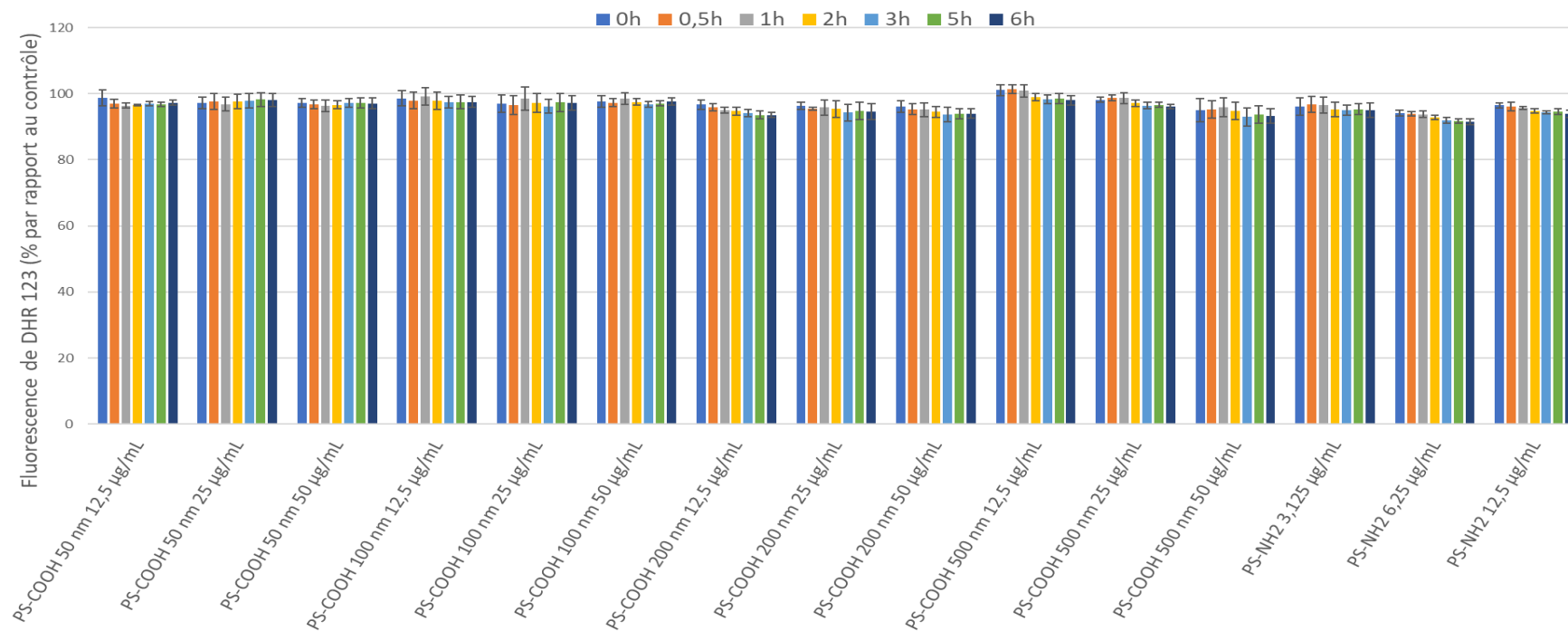
Annexe 3 : Test DHR123 sur les cellules en coculture Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX exposées aux PS-COOH.

PS-COOH de 50 nm ; 100 nm ; 200 nm et 500 nm aux concentrations 12,5 µg/mL, 25 µg/mL et 50 µg/mL et PS-NH₂ 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL et 12,5 µg/mL. Mesures prises à T0h, T0,5h, T1h, T2h, T4h, T6h et T24h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle. Le Luperox a servi de contrôle positif. Les valeurs moyennes ± l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, exposés vs contrôle.



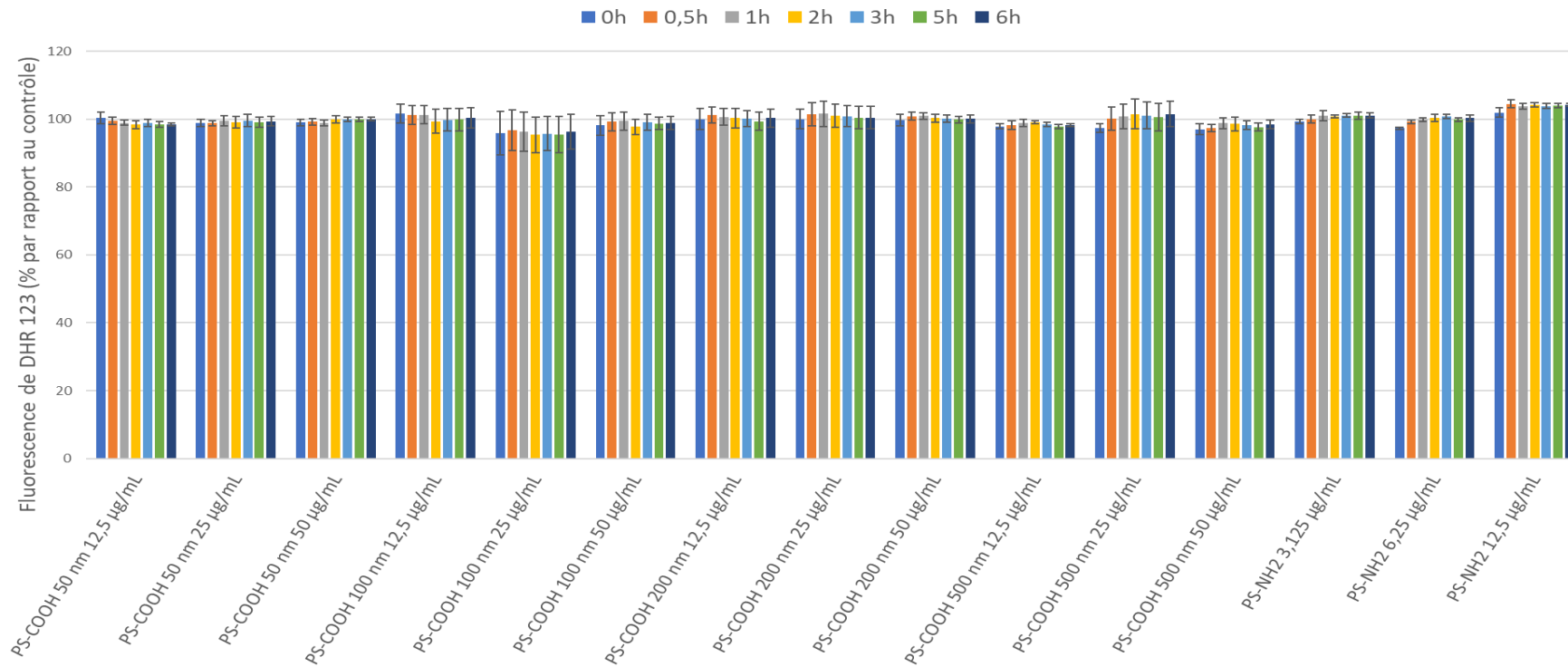
Annexe 4 : Test DHR123 sur les cellules en coculture Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX exposées aux PS-COOH.

PS-COOH de 50nm ; 100 nm ; 200 nm et 500 nm aux concentrations 12,5 µg/mL, 25 µg/mL et 50 µg/mL et PS-NH₂ 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL et 12,5 µg/mL. Mesures prises à T0h, T0,5h, T1h, T2h, T4h, T6h et T24h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle. Le Luperox a servi de contrôle positif. Les valeurs moyennes ± l'écart type de n = 3 expériences indépendantes sont données. * p < 0,05, exposés vs contrôle

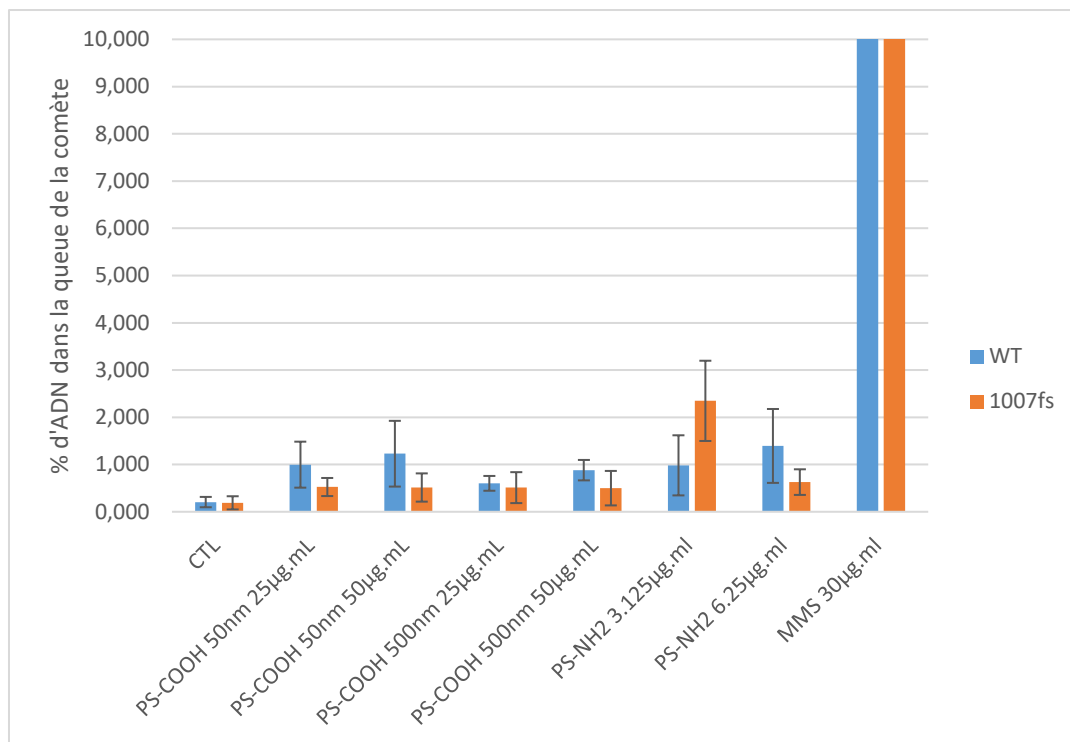


Annexe 5 : Test d'interférence des PS avec le milieu de culture, dans des plaques sans cellule.

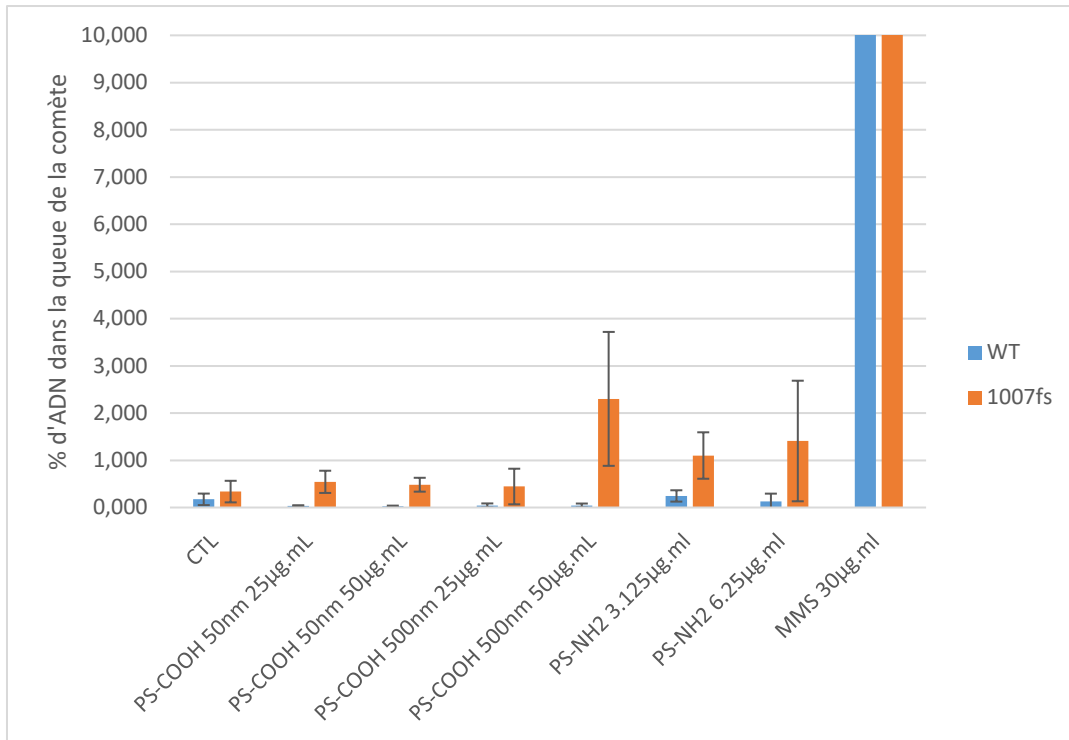
PS-COOH de 50nm ; 100 nm ; 200 nm et 500 nm aux concentrations 12,5 µg/mL, 25 µg/mL et 50 µg/mL et PS-NH₂ 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL et 12,5 µg/mL. Mesures prises à T0h, T0,5h, T1h, T2h, T4h et T6h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle.



Annexe 6 : Test d'interférence des PS dans du milieu de culture, avec 10% de DHR123, dans des plaques sans cellule. PS-COOH de 50nm ; 100 nm ; 200 nm et 500 nm aux concentrations 12,5 µg/mL, 25 µg/mL et 50 µg/mL et PS-NH₂ 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL et 12,5 µg/mL. Mesures prises à T0h, T0,5h, T1h, T2h, T4h et T6h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle.



Annexe 7 : Test des comètes réalisé sur coculture différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et coculture de cellules Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX, après exposition aiguë à des PS-COOH de 50 nm et 500 nm aux concentrations 25 µg/mL et 50 µg/mL et des PS-NH₂ de 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL et 6,25 µg/mL. Les comètes sont visualisées grâce au microscope à fluorescence et au logiciel Comet Assay IV. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ADN par rapport au contrôle. MMS à 30 µg/mL a servi de contrôle positif. Graphe généré à partir des moyennes ± l'écart type des 5 puits exposés par condition, l'expérience n'a été menée qu'une fois.



Annexe 8 : Test des comètes réalisé sur coculture différenciée de cellules Caco2-LV-Nod2 WT / HT29-MTX et coculture de cellules Caco2-LV-Nod2^{1007fs} / HT29-MTX, après expositions répétées à des PS-COOH de 50 nm et 500 nm aux concentrations 25 µg/mL et 50 µg/mL et des PS-NH₂ de 50 nm aux concentrations 3,125 µg/mL et 6,25 µg/mL. Les comètes sont visualisées grâce au microscope à fluorescence et au logiciel Comet Assay IV. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ADN par rapport au contrôle. MMS à 30 µg/mL a servi de contrôle positif. Graphe généré à partir des moyennes ± l'écart type des 5 puits exposés par condition, l'expérience n'a été menée qu'une fois.

Résumé

Les plastiques sont omniprésents dans l'environnement où ils sont retrouvés de manière ubiquitaire dans les eaux, les sols et l'air et à différentes tailles, allant des plastiques macroscopiques aux dimensions nanométriques. La voie d'exposition majeure aux plastiques est via l'ingestion. Or, il a été démontré que les particules de taille inférieure à 150 nm peuvent traverser le tractus gastro-intestinal. Pourtant, l'impact sur la santé humaine de ces nanoplastiques n'est à ce jour pas démontré. C'est pour cela que dans cette étude, des modèles d'épithélium intestinal humain ont été utilisés pour tester la toxicité de nanoparticules de polystyrène, une catégorie de plastique largement présente dans l'environnement. Des modèles d'épithélium en coculture ont été utilisés, composés d'entérocytes Caco2-LV-Nod2 WT ou Caco2-LV-Nod2^{1007fs} et des cellules sécrétrices de mucus HT29-MTX. Ainsi, un modèle d'épithélium sain et un modèle d'épithélium comportant des cellules porteuses d'un gène associé à la maladie de Crohn ont été utilisés. La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique du tube digestif qui est favorisée par des facteurs environnementaux. Des tests pour évaluer la toxicité de ces nanoplastiques ont été effectués afin de déterminer l'impact de ces nanoparticules sur la santé humaine : l'évaluation de la cytotoxicité, la mise en évidence d'espèces réactives de l'oxygène et de marqueurs de l'inflammation et des tests de génotoxicité. Cette étude fournit des informations sur la toxicité des nanoparticules de polystyrène sur les cellules de l'intestin humain, qui sont utiles pour évaluer le risque de ces nanoparticules chez l'homme.

Mots-clés : toxicité ; nanoparticules ; plastique ; polystyrène ; épithélium intestinal