

Exposition orale aux nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) : du franchissement de l'épithélium buccal et intestinal au devenir et aux effets dans l'organisme

Sarah Bettini et Eric Houdeau

UMR 1331 Toxicologie Alimentaire (Toxalim) INRA/INP/UPS, Équipe « Développement Intestinal, Xénobiotiques et ImmunoToxicologie », 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France

Auteur correspondant : Eric Houdeau eric.houdeau@toulouse.inra.fr

Reçu le 15 juillet 2014

Résumé – Face à l'utilisation exponentielle des nanomatériaux dans des produits de consommation courante, dont l'alimentation, les conséquences pour l'homme d'une exposition quotidienne aux faibles doses de nanoparticules posent des questions de santé publique. Parmi les différentes voies d'exposition, la voie orale reste la moins documentée, alors que des nanomatériaux sont couramment utilisés comme additifs alimentaires, ou incorporés à des emballages au contact des aliments, de l'eau, pour bénéficier de leurs propriétés texturantes, anti-microbiennes ou encore comme simples colorants. Les muqueuses buccales et gastro-intestinales sont les premières régions en contact avec les nanoparticules ingérées. Les nanoparticules franchissent ces barrières biologiques pour ensuite se distribuer au compartiment systémique. Bien que des différences existent entre catégories de nanoparticules, compte tenu de leurs propriétés physico-chimiques propres, de la dimension des particules primaires et de leur solubilité éventuelle, l'exemple pris dans cette revue avec le dioxyde de titane (TiO₂) se veut démonstratif des études de toxicité orale menées *in vivo* et *in vitro* pour participer à l'évaluation du risque pour l'homme.

Mots clés : Nanoparticules / additif alimentaire E171 / muqueuses buccales / barrière intestinale / système immunitaire

Abstract – Oral exposure to titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles: from translocation through oral and intestinal epithelia to fate and effects in the organism.

As we are faced with the exponential use of nanomaterials in consumer products, including food, the consequences of daily exposure to nanoparticles at low doses set public health issues for humans. Among the different routes of exposure, the oral route remains the less documented, although nanomaterials are commonly used as food additives, or incorporated into packaging in contact with food or water, to provide their texturing and anti-microbial properties, or as simple colorant agents. The oral and gastrointestinal mucosa are the first regions in contact with the ingested nanoparticles. The latter cross these biological barriers, and distribute to the systemic compartment. Although differences exist between categories of nanoparticles, given differences in their physico-chemical properties, primary particle size and solubility, the example given in this review with titanium dioxide (TiO₂) is intended to illustrate oral toxicity studies conducted *in vivo* and *in vitro* in order to contribute to the risk assessment in humans.

Key words: Nanoparticles / white food pigment E171 / buccal mucosa / intestinal barrier / immune system

Introduction

Dans nos sociétés modernes, les nanomatériaux sont utilisés dans de nombreux produits de consommation courante. Ils sont présents dans le secteur agro-alimentaire, les cosmétiques et écrans solaires, ainsi que dans la pharmacie (applications galéniques par exemple). Leur intérêt repose sur les caractéristiques intrinsèques des nanoparticules, quand leur faible dimension (1 nanomètre = 1 milliardième de mètre) leur confère des propriétés physico-chimiques que n'ont pas les particules de taille plus importante. En octobre 2011, la commission européenne a défini un nanomatériau comme étant « un matériau naturel ou manufacturé ou formé accidentellement contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou d'agglomérats, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. Dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50 % fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil compris entre 1 % et 50 % (recommandation n° 2011/696/UE : JOUE n° L275-20.10.2011). Dans le secteur agro-alimentaire, les nanoparticules sont autorisées comme agents texturants ou colorants dans l'aliment, ou sont incorporées aux emballages alimentaires pour leur conférer des propriétés bactéricides ou de barrière aux gaz, aux UV. Partant d'une définition basée sur l'infiniment petit, la détection et la mesure des nanoparticules dans l'aliment, jusqu'à son suivi dans l'organisme et leurs effets s'avèrent un challenge particulièrement difficile, pourtant nécessaire à la caractérisation du danger et l'évaluation du risque d'exposition orale pour l'Homme. En réponse à l'essor croissant de la fabrication et de l'utilisation des nanoparticules dans notre quotidien, à commencer par l'alimentation, une obligation de déclaration par les industriels de toute substance produite, importée ou distribuée à l'état nanoparticulaire, dès 100 g au moins par an, est rendue obligatoire en France depuis le 1^{er} janvier 2013.

En 2012, sur les 500 000 tonnes de substances nanoparticulaires mises sur le marché, le dioxyde de titane (TiO_2) a été classé quatrième avec une masse de plus de 14 000 tonnes produites (rapport Anses mars 2014). Le TiO_2 est l'oxyde naturel du titane, présent dans la croûte terrestre sous trois formes cristallines : le rutile, l'anatase et le brookite. C'est sous sa forme anatase, seule ou associée au rutile (<20 %), que le TiO_2 est majoritairement utilisé comme pigment blanc et pour son activité biocide, liée à ses propriétés photocatalytiques. Si la majorité de sa production est destinée au marché des peintures ou des

matériaux biocides (vitres autonettoyantes, ciment, linoléum « bio », systèmes de purification de l'eau de ville), le TiO_2 est aussi largement utilisé comme colorant alimentaire sous l'appellation E171 (nomenclature européenne des additifs alimentaires) dans la confiserie, la pâtisserie, les sauces (Weir *et al.*, 2012; Peters *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). Par ailleurs, ses propriétés bactéricides lui promettent également un usage répandu dans le secteur de l'emballage, pour la conception de films minces biosourcés (obtenus à base de produits d'origine végétale) dotés de propriétés anti-microbiennes et appelés à remplacer les plastiques d'origine pétrochimique (Yu *et al.*, 2011).

Exposition alimentaire au dioxyde de titane : le cas de l'additif E171

Dès 2009, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa, devenue l'Anses – Agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail en 2010) concluait dans son rapport sur les « nanoparticules dans l'alimentation » que les études de toxicité par voie orale étaient lacunaires et trop peu documentées quant aux caractéristiques physico-chimiques de ces produits (distribution de tailles et composition chimique initiale, notamment en surface) (Afssa, 2009). Ces études montraient néanmoins qu'après la voie aérienne (inhalation lors de l'exposition professionnelle, accidentelle ou chronique), la voie orale est également une voie majeure d'exposition de l'individu aux nanoparticules présentes dans notre environnement. Ce rapport pointait également l'absence de méthode permettant de suivre les nanoparticules dans la matrice alimentaire, puis dans l'organisme, comme un obstacle majeur aux connaissances sur la toxicité orale de ces substances et au-delà, à l'évaluation du risque qu'elles présentent pour le consommateur (eau, alimentation), ou au professionnel sur son lieu de travail (*e.g.* déglutition des particules déposées dans la sphère ORL). L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) soulignait en outre la nécessité de mieux connaître la forme sous laquelle les nanoparticules franchissaient la barrière digestive et les mécanismes d'internalisation par les cellules, pour l'ensemble des tissus et organes où l'accumulation de particules est constatée.

Dans l'exemple des nanoparticules de TiO_2 à usage alimentaire (colorant blanc E171), il y a consensus pour dire que la contamination par voie orale concerne majoritairement des nanoparticules agrégées entre elles, présentes dans les aliments (Weir *et al.*, 2012). Toutefois, c'est majoritairement à l'échelle de la particule isolée (particule primaire) qu'est évaluée la toxicité, au travers des études *in vitro* sur des lignées de cellules épithéliales intestinales (entérocytes

de type Caco-2) ou, plus récemment, sur des cellules épithéliales buccales (cellules humaines TR146). Si l'additif E171 est composé de particules primaires d'une grande variété de tailles (de 40 à 300 nm, avec un diamètre moyen compris entre 100 et 130 nm), 10 à 40 % d'entre elles, selon les études, présentent au moins une dimension inférieure à 100 nm (Weir *et al.*, 2012; Peters *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). Un pourcentage équivalent de TiO₂ « nano-dimensionné » (10–15 %) est par ailleurs retrouvé après extraction des matrices alimentaires (Peters *et al.*, 2014), principalement dans les chewing-gums où la concentration totale de TiO₂ est la plus élevée, atteignant 5 mg par g de produit (Chen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014). Bien que la proportion de particules primaires nanodimensionnées dans les aliments soit faible (inférieure au seuil de 50 % de la répartition numérique par taille), le E171 additionné aux matrices alimentaires est toutefois considéré comme un matériau « nanocomposite » dans la définition de l'UE (JOUE n° L275-20.10.2011), où cette proportion peut être ramenée entre 1 et 50 % « pour des raisons tenant à la santé publique ».

Pour le consommateur, l'exposition au TiO₂ d'origine alimentaire reste cependant difficile à estimer. Le taux et la dimension des particules contenues dans la nourriture (non mentionnés sur l'étiquetage) sont obtenues *a posteriori* par des méthodes analytiques spécifiques en laboratoire (*e.g.* spectrométrie de masse à torche plasmatique : ICP-MS). Pour l'adulte, la quantité de particules de TiO₂ ingérée quotidiennement a été estimée à 2,5 mg par individu (soit 36 µg/kg de poids corporel/jour pour un individu de 70 kg) pour la seule consommation alimentaire (Lomer *et al.*, 2000), majorée à 1,6 mg/kg/jour en prenant en compte l'alimentation, les traitements médicamenteux (TiO₂ utilisé en galénique) et les dentifrices (Lomer *et al.*, 2004). En 2010, Powell *et al.* ont évalué l'exposition de la population américaine adulte à 71 µg/kg/jour. Plus récemment, Weir *et al.* (2012) ont modélisé l'exposition du consommateur au TiO₂ par l'alimentation en tenant compte des données du *National Diet and Nutrition Survey* (NDNS), pour une population de 100 000 individus. C'est chez l'enfant de moins de 10 ans que l'exposition au E171 est la plus importante (en raison notamment d'une plus forte consommation de confiseries), avec une ingestion moyenne de 1 à 2 mg de TiO₂/kg de poids corporel/jour aux États Unis, contre 2 à 3 mg/kg/jour pour la même catégorie d'âge au Royaume Uni. L'exposition au E171 dépend donc du régime alimentaire, ainsi que de l'usage du dentifrice (TiO₂ étiqueté E171 ou encore CL77891 dans la nomenclature INCI des produits cosmétiques), où la présence de TiO₂ (principalement trouvé sous forme agrégée) varie de 0,7 à 5,6 µg de Ti/mg de dentifrice dans huit produits du commerce (Weir *et al.*, 2012). Ces évaluations

ne prennent cependant pas en compte les oxydes métalliques présents dans les sols et l'eau, estimés respectivement à 15,2 ng/L et 1,28 µg/kg pour le TiO₂ (Gottschalk *et al.*, 2009; Giovanni *et al.*, 2014), ou encore son accumulation dans les végétaux (blé, colza : Larue *et al.*, 2012a,b; concombre : Servin *et al.*, 2013).

Lorsqu'elles sont ingérées, la translocation – c'est-à-dire la capacité des nanoparticules de TiO₂ à passer les barrières biologiques et à migrer vers différents sites de l'organisme – est une donnée essentielle tant au plan quantitatif (pourcentage de la dose absorbée) que qualitatif (mode de passage et d'internalisation cellulaire) pour caractériser les effets et la toxicité de ces produits (Powell *et al.*, 2010). Dans les modèles animaux utiles à la caractérisation du danger d'exposition, selon le mode d'exposition, la dose et la durée du traitement oral, des particules « modèles » de TiO₂ (c'est-à-dire des particules manufacturées de diamètre contrôlé) sont retrouvées dans le foie, la rate et les glandes endocrines (thyroïde, ovaires) (Tassinari *et al.*, 2014) ou encore jusqu'au cerveau pour les plus fortes doses (Shrivastava *et al.*, 2011). Les conséquences à ces niveaux d'exposition (caractérisation du « danger ») sont en cours d'évaluation.

Franchissement des barrières biologiques : de la cavité buccale à l'intestin

De nombreuses questions se posent sur les conséquences pour la santé de l'individu d'une exposition orale à long terme aux nanoparticules, après avoir franchi tous les mécanismes de protection le long de la voie oro-digestive, allant des barrières épithéliales aux mécanismes naturels d'efflux cellulaires des xénobiotiques (transporteurs ABC dans l'intestin, participant à « excréter » les xénobiotiques ayant pénétré les cellules), ou encore la ségrégation par les macrophages (phagocytose des intrants). Dans l'intestin, la question du franchissement de l'épithélium se pose également en termes d'effets potentiellement délétères sur la « fonction de barrière intestinale », indispensable à l'équilibre de l'organisme (perméabilité sélective, absorption de nutriments, échanges hydro-électrolytiques), tout en assurant une protection de l'individu contre les indésirables (pathogènes, toxines bactériennes) (revue dans Principato, 2013).

Muqueuses buccales

La translocation des nanoparticules au travers de la muqueuse buccale est significativement plus élevée

que le passage transcutané, en raison d'une muqueuse très vascularisée et surtout non kératinisée (Roblegg *et al.*, 2012; Teubl *et al.*, 2013). Ces caractéristiques tissulaires augmentent logiquement le potentiel de pénétration des nanoparticules vers les tissus plus profonds (avec de possibles dommages cellulaires et tissulaires dès ces régions), puis vers le reste de l'organisme par passage systémique. La bouche humaine représente une surface totale moyenne de $215 \pm 15 \text{ cm}^2$, composée d'une couche de cellules épithéliales bordant une *lamina propria*, richement vascularisée et composée d'un tissu conjonctif et de cellules musculaires. L'épaisseur de la muqueuse buccale est comprise entre 500 à 800 μm (Harris & Robinson 1992). Elle représente 60 % de la surface totale de la cavité orale (Squier, 1991), avec un temps de renouvellement des cellules épithéliales de 6 à 14 jours (Thomson *et al.*, 1999).

De récentes études sur la translocation buccale des nanoparticules utilisent des modèles cellulaires humains, essentiellement la lignée de cellules épithéliales TR146 en culture (Tay *et al.*, 2013); elles sont complétées par des approches *ex vivo* sur des explants « frais » de muqueuse buccale porcine (Roblegg *et al.*, 2012; Teubl *et al.*, 2014). Ces derniers, montés en cellules de Franz (dispositif de mesure de la diffusion tissulaire), permettent d'apprécier le taux de passage (perméation) vers les couches profondes de la muqueuse, selon la taille des particules (libres, agrégées ou agglomérées), leur *coating* (adjonction en surface de silice et/ou d'alumine, augmentant la stabilité des particules manufacturées) et leur charge de surface (potentiel zêta, reflétant l'intensité de la répulsion ou de l'attraction électrostatique ou électrique entre particules). Le transport des petites molécules au travers de l'épithélium peut se réaliser par deux voies : transcellulaire (par endocytose) et paracellulaire (passage entre les cellules de l'épithélium, en suivant les flux hydroélectrolytiques).

Pour le TiO_2 , la translocation trans-épithéliale a été appréciée récemment sur ces deux modèles expérimentaux (Teubl *et al.*, 2014). Les auteurs ont utilisé trois produits de référence (TiO_2 NM100, 101 et 105), certains de composition cristalline similaire au E171 (100 % anatase : NM100 et 101), d'autres non (80 % anatase/20 % rutile : NM105) et de dimensions variées (NM100 : 200 nm ; NM101 : 7 nm ; NM105 : 22 nm). Si les particules en suspension dans le milieu d'exposition forment rapidement de larges agrégats, 10 à 50 % d'entre elles restent cependant de dimension $<100 \text{ nm}$. De façon intéressante, les auteurs ont remarqué que la pénétration du TiO_2 après 4 h d'exposition était surtout fonction de la taille des particules, les NM100 et NM105 étant trouvées dans les régions supérieure et inférieure de l'épithélium buccal et dans le tissu conjonctif, alors que le matériau

présentant le diamètre le plus faible (NM101) était retrouvé uniquement dans la couche supérieure. Quel que soit le produit, les particules apparaissaient soit internalisées dans des vésicules au sein du cytoplasme (indiquant une endocytose), soit sous forme libre (absence de membrane vésiculaire visible en microscopie électronique). Ces mêmes caractéristiques d'internalisation ont été retrouvées sur les cellules TR146, dès 10 min après le début de l'exposition, suivies après 4 h de traitement d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour le NM101 et le NM105, témoignant d'un stress oxydatif (Teubl *et al.*, 2014). Si la viabilité des cellules ne semblait pas affectée, une production significative de ROS suggérait toutefois un impact toxique en cas d'exposition plus longue. Par exemple, une étude similaire a conclu à la production de molécules pro-inflammatoires et à l'induction d'apoptose après 24 h d'exposition au TiO_2 (Tay *et al.*, 2014). Ainsi dans cet exemple, la comparaison des données *in vitro* et *ex vivo* souligne l'importance des études sur la cavité buccale, quant au devenir et aux effets des nanoparticules par voie orale, en complément des informations sur l'absorption intestinale (ci-après).

Franchissement de la barrière intestinale

Au cours de la digestion gastrique, les nanoparticules sont au contact de sels et de protéines diverses en conditions fortement acides. Très peu, voire aucune dissolution du TiO_2 n'est observée après 24 h dans ces conditions (pH 1,5), ni en conditions basiques à pH 7,4–8, représentatif du milieu intestinal (Cho *et al.*, 2013), où de plus les particules s'agglomèrent entre elles (Brun *et al.*, 2014). À noter que ne sont jamais prises en compte les interactions avec les bactéries du microbiote intestinal (flore commensale), ces dernières étant susceptibles d'internaliser le TiO_2 (donc de moduler leur biodisponibilité), s'accompagnant ou non d'une dysbiose (altération de l'équilibre de la flore bactérienne). La médiocre solubilité du TiO_2 contribue probablement à sa faible absorption intestinale (95 % de la dose sont éliminés avec les fèces) (Myers *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2013), contrairement à d'autres catégories de nanoparticules présentes dans l'alimentation, comme l'oxyde de zinc (ZnO), fortement dissous dans l'environnement gastrique, qui facilite de fait l'absorption vers le compartiment systémique une fois dans l'intestin (Cho *et al.*, 2013). Les 5 % restant de la fraction de TiO_2 absorbée posent pourtant des questions récurrentes, en particulier dans la situation d'une exposition chronique chez l'homme, telle qu'au quotidien entre l'alimentation et l'usage du dentifrice. Comme mentionné précédemment, un passage systémique dans le foie, la rate et les glandes endocrines a déjà été constaté à partir de nanoparticules

modèles et à des doses faibles (Tassinari *et al.*, 2014). Certes, dans cette étude, les particules de TiO₂ étaient toutes inférieures à <100 nm, contrairement au E171, par conséquent le passage dans l'intestin et le devenir systémique du TiO₂ demandent à être ré-évalués pour l'additif alimentaire E171.

In vivo, le site de translocation des nanoparticules au niveau de l'épithélium intestinal reste difficile à déterminer. La nature inorganique des oxydes métalliques, à l'exemple du TiO₂, n'autorise aucun suivi immunohistochimique dans les tissus prélevés après sacrifice, car dépourvus par nature de site antigénique alors que leur échelle nanométrique nécessite également de hauts niveaux de résolution optique (*e.g.* microscopie électronique à transmission, microfluorescence aux rayons X). L'épithélium intestinal est composé d'entérocytes, responsables de l'absorption des nutriments, et jusqu'à 24 % de cellules caliciformes productrices de mucus, constitué de sécrétions glycoprotéiques (mucines), très riches en sucre, jouant un rôle cytoprotecteur de l'épithélium et des muqueuses contre des agressions de toute nature. Outre les voies trans- et paracellulaires au travers de la monocouche épithéliale, déjà évoquées pour la translocation buccale, le franchissement des nanoparticules de TiO₂ vers la muqueuse sous-jacente peut se produire *via* d'autres structures cellulaires spécifiques, notamment les plaques de Peyer localisées dans l'intestin grêle (revue dans Houdeau, 2012). Ce tissu lymphoïde secondaire est une des premières lignes de défense immunitaire du tractus digestif (donc de l'organisme en général). Il est composé en surface majoritairement de cellules M (*microfold cells*) spécialisées dans l'absorption et la translocation de grandes molécules, bactéries et virus depuis la lumière intestinale vers les cellules immunitaires sous-jacentes (lymphocytes T et B et cellules dendritiques) qui contrôlent les réponses inflammatoires, allergiques et de tolérance.

La prise en charge de microparticules minérales (>100 nm) et de particules plus petites (nanodimensionnées) est en grande partie réalisée par les cellules M dans l'intestin. Les nanoparticules sont également transloquées par les entérocytes et les cellules à mucus (Brun *et al.*, 2014). De récents travaux en culture cellulaire ont montré une capacité variable d'absorption et de transport de particules selon que les cellules épithéliales étaient cultivées seules, ou en présence de cellules M ou de cellules à mucus. Plus précisément, des entérocytes (monoculture Caco-2) ne montrent que très peu d'accumulation intracellulaire de TiO₂ (95 % anatase, taille moyenne du grain 12 ± 3 nm) après 24 heures d'exposition, contrairement à une même exposition en présence de cellules à mucus (co-culture Caco-2/HT29-MTX : accumulation x50), atteignant un maximum si ces entérocytes étaient cultivés avec des cellules M (co-culture Caco-2/

RajiB : accumulation x100) (Brun *et al.*, 2014). *In vitro*, des agglomérats submicroniques de TiO₂ passent essentiellement par ce dernier modèle cellulaire, confirmant la notion « clef » de dimension dans le déterminisme du franchissement dans l'intestin.

Chez la souris, la translocation de nanoparticules de TiO₂ (95 % anatase, 12 ± 3 nm) s'observe dès 6 h après une exposition à un seul gavage (12,5 mg/kg). Dans ces conditions, l'élément Titane (Ti, observé par microfluorescence X) a été retrouvé dans les muqueuses de l'iléon et dans les plaques de Peyer réparties le long du grêle (Brun *et al.*, 2014). Cette localisation *in vivo* du TiO₂ dans les sites lymphoïdes a été confirmée chez le rat, 24 h après un gavage à une plus forte dose (100 mg/kg ; anatase, 18 ± 8 nm), sans autre accumulation mesurable dans l'intestin (Janer *et al.*, 2014). Les premiers auteurs (Brun *et al.*, 2014) ont suspecté que le passage *in vivo* des nanoparticules dans et hors les plaques de Peyer pourraient résulter d'une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Cette voie de passage entre les cellules est sous contrôle des jonctions serrées, ancrées dans les membranes au pôle apical des entérocytes et constituées d'un complexe de protéines cytoplasmiques (*zona occludens* ZO-1 et ZO-2) et transmembranaires (*occludine*, *junctional adhesion molecules* (JAM), famille des claudines...) liées au cytosquelette cellulaire (filaments d'actine et de myosine). Leur rôle est d'assurer le maintien architectural de l'épithélium à l'état monostratifié et cohésif, tout en laissant passer l'eau et les électrolytes (flux de calcium, sodium...). *In vivo*, le TiO₂ a la capacité d'induire un remodelage des protéines de jonctions serrées chez la souris exposée *per os*, considéré comme un signe d'altération de l'intégrité épithéliale, susceptible de faciliter la translocation des nanoparticules par cette voie (Brun *et al.*, 2014). *In vitro*, une perturbation des complexes jonctionnels sur des monocouches de cellules Caco-2 a également été constatée, mais pour de fortes concentrations de TiO₂ (1000 µg/ml), et sans rupture évidente de l'intégrité épithéliale en exposition subchronique (jusqu'à 70 h), car essentiellement observée après 6 jours d'exposition. Un tel scénario (concentration au contact de l'intestin et durée d'exposition) reste cependant peu réaliste pour justifier de sa transposition à l'homme (Koenen *et al.*, 2010). Dans l'intestin, on sait toutefois que la perméabilité paracellulaire basale de l'épithélium intestinal est considérablement augmentée en situation de stress psychologique (stress de vie) (revue dans Ménard *et al.*, 2010), dès le plus jeune âge (Moussaoui *et al.*, 2014), une situation pouvant aisément contribuer à augmenter la translocation de particules vers les muqueuses et le reste de l'organisme (Houdeau, 2012). L'hypothèse d'un passage transcellulaire (observée *in vitro* sur Caco-2 dès 10 µg/ml) est à ce

jour essentiellement retenue pour justifier de la translocation évidente de TiO₂ au travers de la barrière intestinale (cellules M > entérocytes). Les données de microscopie électronique ont par exemple montré une perturbation dans l'organisation des microvillosités apicales (bordure en brosse des entérocytes) en présence de TiO₂ dès 10 µg/ml, accompagnée d'une augmentation dose-dépendante des niveaux de calcium libre intracellulaire, un effet facilitant l'internalisation par endocytose (Koeneman *et al.*, 2010). L'ensemble de ces données *in vivo* et *in vitro* révèle, d'une part, l'accumulation intracellulaire de TiO₂ comme prédisposant aux effets propres des particules dans l'intestin, d'autre part, la bioaccessibilité pour le reste de l'organisme, une fois les muqueuses franchies vers le compartiment systémique.

Devenir dans l'organisme et immunotoxicité

Biodisponibilité et accumulation systémique

Comme précédemment évoqué, le degré d'absorption orale est le principal déterminant de la toxicité systémique des nanoparticules pour l'organisme. Les données *in vivo* sur le devenir et l'accumulation dans le foie, la rate, les glandes endocrines, le cerveau après exposition orale restent rares et sujettes à discussion. En cause, l'absence de données relatives au devenir systémique du TiO₂ après exposition buccale (la plupart des expérimentations étant réalisées après gavage gastrique) et la faible biodisponibilité dans l'intestin (Cho *et al.*, 2013; Geraets *et al.*, 2014), pour rappel estimée à 5 % de la dose orale. Une autre notion importante à intégrer est la présence souvent constatée de l'élément Ti chez les animaux « témoins », susceptible de masquer une accumulation faible de Titane de source exogène lors d'expérimentations dès les faibles doses (TiO₂ ≤ 2 mg/kg/jour) (Tassinari *et al.*, 2014) et quelle que soit la durée du traitement (*e.g.* 5 jours, Tassinari *et al.*, 2014 *versus* 13 semaines, Cho *et al.*, 2013). Cette accumulation basale est très variable selon les études, mesurée par exemple chez le rat de 0,07 à 0,8 µg Ti/g de tissu dans le foie, la rate, les reins et le cerveau (Cho *et al.*, 2013), ou encore dans les nœuds mésentériques et l'intestin (1 à 4 µg/g de tissu : Janer *et al.*, 2014), voire absente car sous la limite de détection (Geraets *et al.*, 2014). L'origine de cette contamination basale, quand elle existe, reste à documenter.

Dans l'étude la plus récente où la contamination basale est négligeable (Geraets *et al.*, 2014), chez le rat exposé par voie orale (2,3 mg/animal/jour pendant 5 jours) à différentes formes cristallines et tailles d'agrégats/agglomérats dans le volume de gavage (50–200 nm en majorité), les niveaux de l'élément

Ti mesurés dans le foie dépassent rarement la limite de détection (LOD < 0,03 µg Ti/g de tissu). Chez ces animaux, les nœuds mésentériques (premiers tissus lymphoïdes systémiques après les plaques de Peyer) sont également trouvés positifs, avec une concentration comprise entre 0,1 et 0,3 µg Ti/g de tissu. En général, la fraction absorbée de TiO₂ se distribue rapidement de l'intestin au sang. Cependant, passé le foie et les nœuds mésentériques associés à l'intestin, sa réelle accumulation (*i.e.* mesurable) dans d'autres organes systémiques reste aujourd'hui en évaluation pour les faibles doses d'exposition (proche des niveaux estimés chez l'homme, soit <5 mg/kg/jour). En effet, la faible élimination urinaire du TiO₂ en l'absence de dégradation métabolique dans le sang de la fraction absorbée, justifie que des nanoparticules métalliques (solubilisées ou non) soient disponibles au niveau systémique, avec une possible accumulation dans les organes au long terme, faible mais persistante, à la suite des expositions répétées (Geraets *et al.*, 2014).

Effets immunotoxiques

Après ingestion de TiO₂, la présence significative de Ti dans les organes de l'immunité, allant des plaques de Peyer de l'intestin grêle, aux nœuds mésentériques et au niveau systémique dans la rate (Janer *et al.*, 2014; Geraets *et al.*, 2014; Tassinari *et al.*, 2014), témoigne de la possibilité des nanoparticules à interagir avec les cellules immunitaires, allant des macrophages aux lymphocytes et aux cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes ou CPA) (Winter *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2012). Chez la souris, les travaux de Duan *et al.* (2010) ont par ailleurs étendu la question de l'impact immunotoxique (dénombrement des lymphocytes T, B et *Natural Killer* (NK) dans le sang) aux effets dans le foie et le sang. Après un traitement intra-gastrique continu de 30 jours au TiO₂ anatase (60, 120 ou 250 mg/kg/jour), les auteurs ont conclu que des atteintes histo-pathologiques et d'activités enzymatiques dans le foie apparaissaient en lien avec un déséquilibre de la réponse immunitaire systémique. Cette dernière, attestée par une diminution de la fréquence des lymphocytes T (CD3+, CD4+ et CD8+), B et NK, accompagnée d'une chute d'interleukine-2 (cytokine stimulant la prolifération des lymphocytes), témoigne d'un effet immuno-suppressif aux relativement fortes doses de TiO₂ (20 fois supérieures aux estimations chez l'homme).

Au contraire, dans l'intestin, l'accumulation de TiO₂ au niveau des plaques de Peyer peut s'accompagner d'une réponse inflammatoire (production de cytokines) dans les muqueuses intestinales, due par exemple à une phagocytose rapide (<6 h) par

les macrophages et l'activation de l'inflammasome, un complexe protéique impliqué dans la cascade inflammatoire (Becker *et al.*, 2012). Dans les tissus lymphoïdes, les cellules dendritiques ont un rôle de « sentinelle » dans l'intestin, indispensables pour l'induction de réponses immunitaires contre les agents pathogènes et le maintien de la tolérance envers les antigènes alimentaires et les bactéries commensales qui composent notre microbiote (Turner, 2009). Le potentiel immunogène du TiO₂ (77 % anatase/23 % rutile) sur ces cellules a été vérifié *in vitro* chez la souris, avec peu d'influence à l'état micrométrique sur la viabilité cellulaire et la réponse cytokinique, mais avec une induction de la maturation des cellules dendritiques (augmentation d'expression du MHC-II, CD80, CD86 nécessaire à la présentation des antigènes aux lymphocytes) et également l'activation de l'inflammasome lorsque les particules sont nanodimensionnées (Winter *et al.*, 2011). Ces effets s'accompagnent d'un stress oxydatif (la production de ROS active l'inflammasome et la production de cytokines), essentiellement dû à la forme cristalline anatase et dépendant de la surface spécifique des nanoparticules. À noter cependant que ces effets ont été observés sur des cultures cellulaires exposées à 20 µg de particules/cm², un scénario qui relève essentiellement de la « caractérisation du danger » (relation concentration/effet sur les tissus cibles). Enfin, la production de ROS a également été observée sur des lymphocytes exposés *in vitro* à du TiO₂ nanoparticulaire (25 nm, 85 % anatase/15 % rutile), dès 20 µg/ml après 12 h d'exposition, et selon un effet dose-dépendant (Kang *et al.*, 2008). Les auteurs ont de plus montré que le stress oxydant induit par le TiO₂ s'accompagnait d'une génotoxicité (*i.e.* dommages à l'ADN) dans les lymphocytes (formation de micronoyaux, cassures double-brin), déjà constatée dans différents modèles cellulaires (revue dans Sycheva *et al.*, 2011). Enfin, Li *et al.* (2010) ont montré que des nanoparticules de TiO₂ anatase pouvaient s'insérer, *in vivo*, dans l'ADN double brin et en modifier la structure secondaire. Après exposition orale chez le rat ou la souris, des nanoparticules de TiO₂ sont par exemple retrouvées dans des noyaux de cellules, par microscopie électronique ou imagerie Raman (Li *et al.*, 2010; Ahlinder *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2014), une localisation pouvant contribuer à la cytotoxicité et génotoxicité du produit (Jin *et al.*, 2013). Enfin, notons que si des particules de TiO₂ sont effectivement transloquées vers le cerveau après absorption intestinale, un passage au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE) apparaît plausible, compte tenu de données récentes sur des modèles cellulaires de BHE. Dans ces conditions, le franchissement par des nanoparticules de TiO₂ (Aeroxide P25, 75 % anatase) s'accompagne d'une réponse inflammatoire dès 4 h post-exposition (Brun *et al.*, 2012).

Quel que soit le type de cellule immunitaire considéré (macrophages, CPA, lymphocytes) et la dimension des particules de TiO₂ (nanométrique primaire ou agrégées/agglomérées), si un tel inventaire d'impacts se produit dans les conditions d'une exposition orale (faible mais répétée dans la population générale, ou forte car accidentelle en milieu professionnel), le risque suspecté est un déséquilibre de l'homéostasie immunitaire dans l'organisme, commençant dès l'intestin, un terrain susceptible de prédisposer à des pathologies variées (infection, inflammation locale ou systémique) (revue dans Principato, 2013).

Conclusion

Si la toxicité des nanomatériaux *via* les voies respiratoires a été abondamment étudiée au cours de la dernière décennie, pour répondre à l'évaluation du risque professionnel par inhalation, on ignore encore beaucoup de choses sur les conséquences de leur ingestion pour la santé humaine. Les études de toxicité par voie orale sont rares, fréquemment cantonnées à des modèles cellulaires, et pour des doses et concentrations peu en rapport avec l'exposition réelle chez l'homme. De plus, ces travaux ont souvent été menés avec des particules « modèles » dont la nature, les dimensions et les propriétés physico-chimiques ne sont pas représentatives de celles réellement présentes dans l'eau et l'aliment. Dans cette revue, l'exemple pris avec le dioxyde de titane souligne la grande complexité de l'évaluation du risque d'exposition orale aux nanoparticules, quand les additifs alimentaires nanocomposites présentent une distribution de tailles (en particules primaires, en agrégats) variable selon la source commerciale, la transformation dans les matrices alimentaires et, une fois absorbés, leur ré-agglomération dans les fluides digestifs : autant de facteurs qui, outre la dose, conditionnent leur translocation/accumulation et, de là, leurs effets au niveau local et systémiques.

Références

- Afssa mars 2009. <http://www.afssa.fr/Documents/RCCP-Ra-NanoAlimentation.pdf>.
- Ahlinder L., Ekstrand-Hammarström B., Geladi P., Osterlund L., Large uptake of titania and iron. Oxide nanoparticles in the nucleus of lung epithelial cells as measured by Raman Imaging and multivariate classification. *Biophys J*, 2013, 105, 310–319.
- Becker H.M., Bertschinger M.M., Rogler G., Microparticles and their impact on intestinal immunity. *Dig Dis*, 2012, 30, 47–54.

- Brun E., Carrière M., Mabondzo A., *In vitro* evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO₂ nanoparticles. *Biomaterials*, 2012, 333, 886–896.
- Brun E., Barreau F., Veronesi G., Fayard B., Sorieul S., Chanéac C., Carapito C., Rabilloud T., Mabondzo A., Herlin-Boime N., Carrière M., Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through *ex vivo*, *in vivo* and *in vitro* gut epithelia. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11, 13.
- Chen X.X., Cheng B., Yang Y.X., Cao A., Liu J.H., Du L.J., Liu Y., Zhao Y., Wang H., Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. *Small*, 2013, 9, 1765–1774.
- Cho W.S., Kang B.C., Lee J.K., Jeong J., Che J.H., Seok S.H., Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10, 9.
- Duan Y., Liu J., Ma L., Li N., Liu H., Wang J., Zheng L., Liu C., Wang X., Zhao X., Yan J., Wang S., Wang H., Zhang X., Hong F., Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials*, 2010, 31, 894–899.
- Geraets L., Oomen A.G., Krystek P., Jacobsen N.R., Wallin H., Laurentie M., Verharen H.W., Brandon E.F., de Jong W.H., Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11, 30.
- Giovanni M., Tay C.Y., Setyawati M.I., Xie J., Ong C.N., Fan R., Yue J., Zhang L., Leong D.T., Toxicity profiling of water contextual zinc oxide, silver, and titanium dioxide nanoparticles in human oral and gastrointestinal cell systems. *Environ Toxicol*, 2014 [doi: 10.1002/tox.22015].
- Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B., Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ Sci Technol*, 2009, 43, 9216–9222.
- Harris D., Robinson JR., Drug delivery *via* the mucous membranes of the oral cavity. *J Pharm Sci*, 1992, 81, 1–10.
- Houdeau E., Nanoparticules et barrière intestinale : comprendre les mécanismes de franchissement. *Innov Agro*, 2012, 24, 105–112.
- Janer G., Mas del Molino E., Fernández-Rosas E., Fernández A., Vázquez-Campos S., Cell uptake and oral absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol Lett*, 2014, 228, 103–110.
- Jin C., Tang Y., Fan X.Y., Ye X.T., Li X.L., Tang K., Zhang Y.F., Li A.G., Yang Y.J., *In vivo* evaluation of the interaction between titanium dioxide nanoparticle and rat liver DNA. *Toxicol Ind Health*, 2013, 29, 235–244.
- JOUE n° L275-20.10.2011 : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:FR:PDF>.
- Kang S.J., Kim B.M., Lee Y.J., Chung H.W., Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 2008, 49, 399–405.
- Koeneman B.A., Zhang Y., Westerhoff P., Chen Y., Crittenden J.C., Capco D.G., Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol Toxicol*, 2010, 26, 225–238.
- Larue C., Veronesi G., Flank A.M., Surble S., Herlin-Boime N., Carrière M., Comparative uptake and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat and rapeseed. *J Toxicol Environ Health A*, 2012a, 75, 722–734.
- Larue C., Laurette J., Herlin-Boime N., Khodja H., Fayard B., Flank A.M., Brisset F., Carrière M., Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase. *Sci Total Environ*, 2012b, 431, 197–208.
- Li N., Ma L.L., Wang J., Zheng L., Liu J., Duan Y.M., Liu H., Zhao X., Wang H., Hong F., Xie Y., Interaction between nano-anatase TiO₂ and liver DNA from mice *in vivo*. *Nanoscale Res Lett*, 2010, 5, 108–115.
- Lomer M.C.E., Thompson R.P.H., Comisso J., Keen C.L., Powell J.J., Determination of titanium dioxide in foods using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analyst*, 2000, 125, 2339–2343.
- Lomer M.C., Hutchinson C., Volkert S., Greenfield S.M., Catterall A., Thompson R.P., Powell J.J., Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br J Nutr*, 2004, 92, 947–955.
- Ménard S., Cerf-Bensussan N., Heyman M., Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol*, 2010, 3, 247–259.
- Moussaoui N., Braniste V., Ait-Belgnaoui A., Gabanou M., Sekkal S., Olier M., Théodorou V., Martin P.G., Houdeau E., Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial defect in maternal-deprived rats. *PLoS One*, 2014, 9, e88382.
- Myers W.D., Ludden P.A., Nayigihugu V., Hess B.W., Technical note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J Anim Sci*, 2004, 82, 179–183.
- Peters R.J., van Bommel G., Herrera-Rivera Z., Helsper H.P., Marvin H.J., Weigel S., Tromp P.C., Oomen A.G., Rietveld A.G., Bouwmeester H., Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *J Agric Food Chem*, 2014, 9, 6285–6293.
- Powell J.J., Faria N., Thomas-McKay E., Pele L.C., Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J Autoimmun*, 2010, 34, J226–J233.
- Principato M., Gastrointestinal Immunoregulation and the Challenges of Nanotechnology in Foods. In Innocenzo Muzzalupo (Ed.), *Agricultural and Biological Sciences "Food Industry"*, 2013, 491–517.

- Roblegg E., Fröhlich E., Meindl C., Teubl B., Zaversky M., Zimmer A., Evaluation of a physiological *in vitro* system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa. *Nanotoxicology*, 2012, 6, 399–413.
- Servin A.D., Morales M.I., Castillo-Michel H., Hernandez-Viezcas J.A., Munoz B., Zhao L., Nunez J.E., Peraltavidea J.R., Gardea-Torresdey J.L., Synchrotron verification of TiO₂ accumulation in cucumber fruit: a possible pathway of TiO₂ nanoparticle transfer from soil into the food chain. *Environ Sci Technol*, 2013, 47, 11592–11598.
- Shrivastava R., Raza S., Yadav A., Kushwaha P., Flora S.J., Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chem Toxicol*, 2014, 37, 336–347.
- Squier C.A., The permeability of oral mucosa. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1991, 2, 13–32.
- Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Iurchenko V.V., Dauge-Dauge N.O., Kovalenko M.A., Krivtsova E.K., Durnev A.D., Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. *Mutat Res*, 2011, 726, 8–14.
- Tassinari R., Cubadda F., Moracci G., Aureli F., D'Amato M., Valeri M., De Berardis B., Raggi A., Mantovani A., Passeri D., Rossi M., Maranghi F., Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology*, 2014, 8, 654–662.
- Tay C.Y., Fang W., Setyawati M.I., Chia S.L., Tan K.S., Hong C.H., Leong D.T., Nano-hydroxyapatite and nano-titanium dioxide exhibit different subcellular distribution and apoptotic profile in human oral epithelium. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6, 6248–6256.
- Teubl B.J., Absenger M., Fröhlich E., Leitinger G., Zimmer A., Roblegg E., The oral cavity as a biological barrier system : design of an advanced buccal *in vitro* permeability model. *Eur J Pharm Ther*, 2013, 84, 386–393.
- Teubl B.J., Leitinger G., Schneider M., Lehr C.M., Fröhlich E., Zimmer A., Roblegg E., The buccal mucosa as a route for TiO₂ nanoparticle uptake. *Nanotoxicology*, 2014, 29, 1–9.
- Thomson P.J., Potten C.S., Appleton D.R., Mapping dynamic epithelial cell proliferative activity within the oral cavity of man: a new insight into carcinogenesis? *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1999, 37, 377–383.
- Turner J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9, 799–809.
- Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Hristovski K., von Goetz N., Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol*, 2012, 46, 2242–2250.
- Winter M., Beer H.D., Hornung V., Krämer U., Schins R.P., Förster I., Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology*, 2011, 5, 326–40.
- Yang Y., Doudrick K., Bi X., Hristovski K., Herckes P., Westerhoff P., Kaegi R., Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environ Sci Technol*, 2014, 48, 6391–6400.
- Yu B., Leung K.M., Guo Q., Lau W.M., Yang J., Synthesis of Ag-TiO₂ composite nano thin film for antimicrobial application. *Nanotechnology*, 2011, 22, 115603.