

Faculté des bioingénieurs

Développement d'un modèle de cancer pulmonaire induit par des nanotubes de carbone

Auteur : Antoine Quoidbach
Promoteur : François Huaux
Co-promoteur : Jean-François Rees
Lecteurs : Pierre van der Bruggen et René Rezsöszözy
Année académique 2021-2022
Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Bioingénieur : master en sciences agronomiques – option santé humaine

Remerciements

Pour ce mémoire, je tenais d'abord à remercier mon promoteur le Pr François Huaux pour m'avoir épaulé et conseillé toute l'année. Il m'a permis d'évoluer, m'a appris la rigueur scientifique et a fait grandir mon intérêt pour l'immunologie. Merci à lui pour tous ces moments de réunion passés en tête à tête durant l'année qui m'ont permis d'avancer sereinement dans mon mémoire.

Ensuite, je remercie l'équipe de l'IREC : Michelle De Beukelaer, Aurélie Daumerie, Caroline Bouzin et Marc De Bournonville. Ils m'ont formé pour toutes les manipulations que j'ai pu réaliser car je n'avais aucune base en histologie. Merci à eux pour leur patience, leurs conseils et pour s'être rendu disponible lorsque j'avais des questions.

Mes remerciements vont aussi à Etienne Marbaix de la faculté de médecine à l'institut de Duve pour m'avoir partagé ses connaissances précieuses. En tant que pathologiste, il a grandement contribué à ce travail.

Je remercie de manière générale toute l'équipe du LTAP pour l'ambiance bienveillante qui régnait au labo et pour leurs nombreux conseils et feedback constructifs sur mon travail. Parmi l'équipe du LTAP, je tenais en particulier à remercier les techniciens du labo : Yousof Yakoub et Jean-François Geuens pour leur travail rigoureux lors des expériences.

Enfin, je tenais à remercier les deux doctorantes qui partageaient leur bureau cette année avec moi : Léa Hiéronimus et Chiara Longo. Elles n'ont pas hésité à partager leur expérience et leur savoir, ainsi qu'à m'octroyer de leurs précieux conseils durant toute l'année.

Table des matières

Remerciements	1
1. Abréviations	3
2. Avant-propos	4
3. Abstract	5
4. Introduction	6
4.1 La problématique des fibres	6
4.2 Particules cancérogènes.....	7
4.3 Le cancer pulmonaire	8
4.4 Mécanismes d'apparition du cancer induits par les CNT	11
4.4.1 Effets directs.....	11
4.4.2 Inflammation.....	11
4.4.3 Immunosuppression.....	13
4.5 Modèles murins de mésothéliome et de cancer pulmonaire	15
5. Objectifs et stratégies	17
5.1 Objectifs	17
5.2 Stratégies expérimentales.....	17
6. Matériels et méthodes	18
6.1 Exposition des souris aux CNT	18
6.1.1 Conditions expérimentales	18
6.1.2 Expérience 1 : comparaison 3MC vs CNT-7 chez les A/J	19
6.1.3 Expérience 2 : comparaison CNT-T vs CNT-7 chez les A/J.....	20
6.1.4 Expérience 3 : comparaison CNT-T vs CNT-7 vs CB chez les B6.....	21
6.2 Mise en paraffine.....	22
6.3 Coupe des blocs.....	22
6.4 La coloration	23
6.5 Analyse qualitative des tumeurs	24
6.6 Analyse quantitative des tumeurs.....	26
7. Résultats	29
7.1 Effet carcinogénique du 3MC et des CNT-7	29
7.2 Comparaison des effets carcinogéniques des CNT-T et des CNT-7	30
7.3 L'activité des particules de CB	32
7.4 Analyse histologique du foie et des reins.....	34
8. Conclusion générale	35
9. Discussion	36
9.1 Perspectives	37
10. Bibliographie	39

1. Abréviations

3MC	3-méthylcholanthrène
a.o.p	Aspiration oro-pharyngée
CAF	Cancer-associated fibroblast
CB	Carbon Black
CD	Cluster de différenciation
CNT	Nanotubes de carbone
CTL	Contrôle
H&E	Hématoxyline éosine
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL	Interleukine
i.p	Intra-péritonéale
LTc	Lymphocyte T cytotoxique
LTh	Lymphocyte T helper
LTreg	Lymphocyte T régulateur
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MWCNT	Mutli-walled carbon nanotube
NK	Natural killer
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	Reactive oxygen species
SWCNT	Single walled carbon nanotube
TAM	Tumor-associated macrophage
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor

2. Avant-propos

Les nanotubes de carbones (CNT) sont des nanomatériaux constitués de feuillets d'atomes de carbone, enroulés sur eux-mêmes pour donner cette forme de tube. Les CNT sont aujourd'hui exploités industriellement car ils confèrent aux matériaux des propriétés électroniques et mécaniques intéressantes. Certains CNT en forme d'aiguille ont cependant été classés comme particules potentiellement cancérigènes pour l'Homme. Des études précédentes ont montré que ces CNT rectilignes induisaient le mésothéliome malin et le cancer pulmonaire chez le rat. Les mécanismes immunologiques liés à ces cancers restent à découvrir. Le but de notre étude est de développer un modèle de cancer pulmonaire chez la souris en utilisant des CNT afin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans le développement de la pathologie cancéreuse.

A partir de souris A/J, nous avons développé un modèle de co-carcinogénicité en utilisant des CNT-7 (rectilignes), des CNT-T (courbés, non mésothéliomagéniques) et du 3-méthylcholanthrène (3MC). Le 3MC est un carcinogène chimique dont l'activité cancéreuse est amplifiée par des particules réactionnelles. Dans un second temps, nous avons exposé des souris B6 aux mêmes particules, ainsi qu'au CB (carbon black, non cancérigène) toujours en présence du 3MC. Le carcinogène 3MC est injecté en faible quantité (250 µg) par injection intra-péritonéale tandis que les particules sont injectées par aspiration oro-pharyngée (100 µg).

Le potentiel cancérigène a été mesuré en utilisant l'imagerie pulmonaire (Scanner Leica SCN400, programme Halo). Les résultats montrent que la co-administration de CNT-7 et de 3MC induit le développement d'adénocarcinomes papillaires infiltrants chez les souris A/J, confirmant l'intérêt du modèle. Les CNT-T ont, par ailleurs, des effets génotoxiques pulmonaires plus élevés que les CNT-7 chez les souris A/J et les B6. Les souris B6 exposées au CB ne développent pas d'adénocarcinome papillaire.

En conclusion, nous avons développé un modèle d'adénocarcinome papillaire pulmonaire en utilisant des CNT chez la souris. Cet outil sera précieux pour étudier le rôle des médiateurs et des cellules immunitaires dans le développement du cancer des poumons induit par des particules inhalées.

3. Abstract

Carbon nanotubes (CNT) are nanomaterials made of sheets of carbon atoms, rolled up to give this tube shape. CNTs are nowadays exploited industrially because they give materials interesting electronic and mechanical properties. However, some needle-shaped CNTs have been classified as potentially carcinogenic particles for humans. Previous studies have shown that these straight CNTs induced malignant mesothelioma and lung cancer in rats. The immunological mechanisms related to these cancers remain to be discovered. The aim of our study is to develop a lung cancer model in mice using CNTs to better understand the immunological mechanisms involved in the development of the cancer pathology.

Using A/J mice, we developed a co-carcinogenicity model using CNT-7 (straight), CNT-T (curved, non-mesotheliomagenic) and 3-methylcholanthrene (3MC). 3MC is a chemical carcinogen whose cancer activity is enhanced by reaction particles. In a second step, we exposed B6 mice to the same particles, as well as to CB (carbon black, non-carcinogenic) always in the presence of 3MC. The carcinogen 3MC was injected in small quantities (250 µg) by intraperitoneal injection while the particles were injected by oro-pharyngeal aspiration (100 µg).

The carcinogenic potential was measured using lung imaging (Leica SCN400 scanner, Halo program). The results show that the co-administration of CNT-7 and 3MC induces the development of infiltrating papillary adenocarcinomas in A/J mice, confirming the interest of the model. CNT-T also had higher pulmonary genotoxic effects than CNT-7 in A/J and B6 mice. B6 mice exposed to CB do not develop papillary adenocarcinoma.

In conclusion, we have developed a lung papillary adenocarcinoma model using CNT in mice. This tool will be valuable to study the role of mediators and immune cells in the development of lung cancer induced by inhaled particles.

4. Introduction

4.1 La problématique des fibres

Les nanotubes de carbone aussi appelés CNT sont des nanomatériaux constitués de plusieurs feuillets d'atomes de carbone. Ces feuillets sont recouverts d'une couche de graphène enroulée donnant cette forme de tube aux CNT. Les CNT prennent la forme de fibres au niveau microscopique (Figure 1). (Negri et al, 2020)

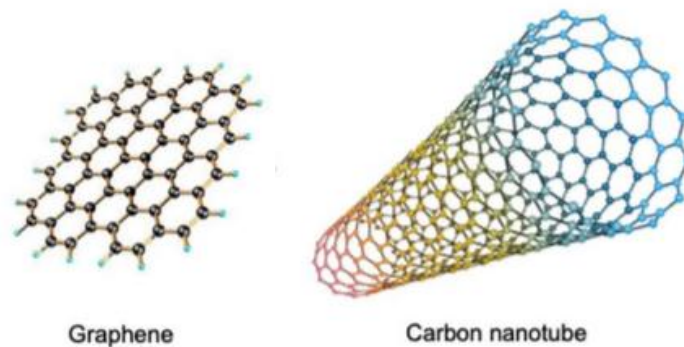


Figure 1 : Illustration du graphène et des CNT (Negri et al, 2020)

Les CNT sont présents sous deux formes en fonction du nombre de couches de graphènes qu'ils comportent. Il y a d'une part, les « Single Walled Carbon NanoTube » (SWCNT) qui ne contiennent qu'une seule couche de graphène avec un diamètre de 1 à 3 nm. D'autre part, les « Multi-Walled Carbon Nanotube » (MWCNT) avec plusieurs couches de graphène pour un diamètre total allant de 10 à 200 nm. (Grosse et al., 2014)

Les nanotubes de carbone sont tout d'abord uniques par leurs dimensions : ils sont longs de plusieurs microns et larges de seulement quelques nanomètres. Au-delà de ces caractéristiques géométriques, la structure et la composition des CNT leur confèrent des propriétés électriques, thermiques et mécaniques très intéressantes (Kumar Babele et al., 2021). De par leurs propriétés intéressantes, ces nanoparticules sont notamment utilisées comme additifs dans les polymères, les thermoplastiques et les élastomères (Périé, 2011). Finalement, les CNT sont aussi utilisés comme support biocompatible pour la régénération des tissus dans le secteur de l'ingénierie tissulaire. (Veetil et Ye, 2009 ; Pacchini, 2009)

Cependant, les CNT ont des propriétés physico-chimiques particulières : les CNT, de par leur taille de l'ordre du nanomètre, leur forme de fibre, leur composition et leur bio-persistance, en font des particules qui pénètrent facilement dans les voies respiratoires

et agissent comme un corps étranger. La bio-persistance des CNT peut provoquer des effets néfastes à long terme dans l'organisme. (Elgrabli et Lacroix, 2009 ; Dong, 2020)

De plus, les CNT possèdent des similarités avec un autre composé fibreux, l'amiante. Les 2 composés ont une forme et une taille identique. Jaurant et al. ont évoqué la question des risques des CNT pour la santé humaine. (Jaurand et al., 2009 ; Dong, 2020)

4.2 Particules cancérigènes

L'inhalation de fibres persistantes et en forme d'aiguille comme l'amiante et certains CNT peut être toxique pour l'organisme, même si le temps de latence entre le moment d'exposition aux particules et le développement de la maladie peut être très long (jusqu'à 40 ans). (Cheng et al., 2020)

Toute exposition aux fibres cancérigènes va augmenter le risque d'apparition d'un cancer dans l'organisme. Le type de cancer induit par ces fibres dépend du site d'action des fibres dans l'organisme. Si les fibres d'amiante atteignent la cavité pleurale, alors il y a un risque que l'individu développe le cancer de la plèvre, plus connu sous le nom de mésothéliome. Les fibres peuvent aussi passer dans les bronches et induire le cancer des poumons. (INRS)

Selon le registre « Cancer Fact Sheet » qui répertorie tous les cas de cancer en Belgique, plus de 85% des cas de mésothéliome pleural malin sont dus à une exposition à l'amiante (Cancer Fact Sheet). Le mésothéliome est une tumeur maligne qui affecte les cellules mésothéliales. Le plus fréquent est le mésothéliome pleural malin. Il est à l'origine du cancer de la plèvre localisé au niveau de l'enveloppe des poumons. La plèvre est la membrane qui recouvre le parenchyme pulmonaire, le diaphragme et la cage thoracique. Elle a pour but de faciliter le glissement des poumons sur les parois thoraciques. Une fois la maladie contractée par le patient, elle va provoquer 2 phénomènes majeurs. D'une part, l'épaississement des deux feuillets situés au niveau de la cage thoracique et des poumons. D'autre part, le remplissage par un liquide de la cavité pleurale située entre ces 2 feuillets. Le mésothéliome va provoquer des difficultés respiratoires chez le patient pouvant aller jusqu'au décès dans les cas les plus graves (Donaldson et al., 2013). Bien que l'utilisation d'amiante soit interdite depuis 1998 en Belgique à cause de sa haute toxicité, de nombreux cas de cancers sont seulement détectés aujourd'hui en raison de la longue

période de latence entre l'exposition et l'apparition du cancer. Il a alors fallu trouver d'autres composés aux propriétés similaires afin de la remplacer dans l'industrie. (INRS) Les CNT qui ont des propriétés physico-chimiques très similaires aux fibres d'amiante peuvent aussi être carcinogènes. D'après une publication récente (Orsi et al., 2021), certaines fibres de CNT provoquent en effet l'apparition d'un mésothéliome chez le rat. Les CNT peuvent également déclencher des réactions inflammatoires et induire le cancer pulmonaire (Dong et Ma, 2019).

L'exposition aux fibres inhalables induit une production des ROS dans les cellules épithéliales qui mène au stress oxydatif. Le stress oxydatif déclenche un ensemble de réactions via différents mécanismes qui vont entraîner des modifications cellulaires et promouvoir l'installation et le développement du cancer pulmonaire. (Valavanidis et al., 2013)

4.3 Le cancer pulmonaire

En 2020, GLOBOCAN a estimé l'incidence du cancer pulmonaire à plus de 2 millions de nouveaux cas et la mortalité à 1,8 million de décès dans le monde en 1 an (Sung et al., 2021). Il s'agit du cancer qui compte le plus de cas et qui cause le plus de décès chaque année dans le monde chez les hommes. Cela s'explique en partie par le fait que le cancer pulmonaire est asymptomatique à ses débuts et est souvent découvert à des stades beaucoup plus avancés. (Nasim et al., 2019 ; Bade et Dela Cruz, 2020)

Il est le plus souvent induit par le tabagisme, mais il peut aussi être induit par l'inhalation de particules persistantes telles que les CNT et l'amiante. Ces particules pénètrent dans les cellules épithéliales pulmonaires et déclenchent une série de réactions inflammatoires et immunosuppressives provoquant le cancer pulmonaire. Il est d'ailleurs possible en histologie d'observer des foyers inflammatoires autour des fibres cancérogènes (Figure 2). (Sargent et al., 2014)

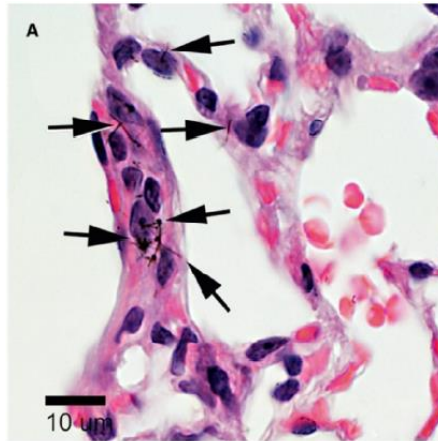


Figure 2 : Observation des fibres de CNT dans le tissu pulmonaire (Sargent et al., 2014)

L'adénocarcinome pulmonaire désigne un type de cancer pulmonaire. L'adénocarcinome est une tumeur maligne qui se développe aux dépens des cellules constituant l'épithélium glandulaire. Lorsque cette tumeur cancéreuse se développe au niveau des poumons, elle affecte les cellules glandulaires épithéliales du tissu pulmonaire. L'adénocarcinome fait partie des carcinomes « non à petites cellules » (NSCLC) qui est la catégorie la plus importante de cancer du poumon. Il existe différents sous-types d'adénocarcinomes qui viennent spécifier la forme des cellules tumorales invasives. (Belgian Cancer Registry ; Mansuet-Lupo, 2018)

Chez le rat exposé aux CNT, l'adénocarcinome le plus fréquent est l'adénocarcinome papillaire (Figure 3). Il se caractérise par la formation de noyaux fibrovasculaires tapissés de cellules néoplasiques qui remplacent la muqueuse des alvéoles (Belgian Cancer Registry). L'adénocarcinome papillaire est un type d'adénocarcinome invasif dérivé de l'adénocarcinome lépidique pulmonaire lié à la formation unicellulaire d'une couche recouvrant le tissu pulmonaire. Le stade d'adénocarcinome est le stade le plus avancé de la tumeur. Une phase pré-cancéreuse peut se former avant le cancer pulmonaire. Durant cette phase, les fibres cancérigènes vont induire des changements cellulaires et une multiplication cellulaire importante menant à l'hyperplasie (stade pré-cancéreux). L'hyperplasie peut évoluer en cancer pulmonaire suite au développement de la zone tumorale, mais ne va pas systématiquement se transformer en stade cancéreux. (Mansuet-Lupo, 2018 ; Hutchinson et al., 2019 ; Saleh et al., 2020)

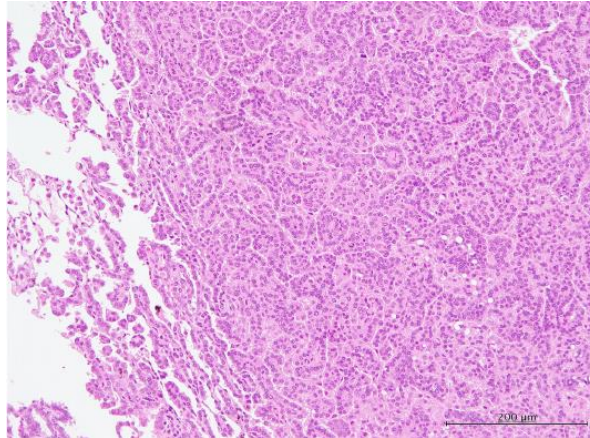


Figure 3 : Cancer broncho-alvéolaire chez le rat exposé aux CNT-T (Saleh et al., 2020)

Il existe des traitements qui vont empêcher le développement du cancer. Ces traitements visent à perturber la signalisation inhibitrice entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires. Le but étant que les cellules tumorales n'interfèrent pas avec les défenses immunitaires afin de garder les défenses actives contre la tumeur. Différentes voies contribuent à la progression et la survie du cancer pulmonaire, il n'est donc pas simple de bloquer ou inhiber toutes ces pistes pour trouver un traitement efficace. Une autre méthode utilisée par les pathologistes pour empêcher le développement du cancer pulmonaire est la prévention. Cette solution moins coûteuse permet de détecter les premières traces d'un cancer pulmonaire le plus tôt possible afin d'anticiper l'installation de la tumeur. (Ruiz-Cordero et Devine, 2020)

Les mécanismes spécifiques liés à l'exposition aux CNT qui mènent au cancer pulmonaire ne sont pas encore complètement connus. Cependant, le mésothéliome et le cancer pulmonaire sont induits par un mécanisme identique lors d'une exposition aux fibres cancérogènes. Les mécanismes du cancer pulmonaire induit par les CNT comprennent les effets directs liés à l'activité génotoxique des fibres, l'inflammation et l'immunosuppression. (Kumar Babele et al., 2021)

4.4 Mécanismes d'apparition du cancer induits par les CNT

4.4.1 Effets directs

Les CNT inhalés sont capables de libérer des molécules oxydantes réactionnelles comme les ROS avant leur prise en charge par les cellules pulmonaires (Figure 4). Lorsque la quantité de ROS produite est trop importante, c'est-à-dire lorsque l'augmentation de production de ROS est plus importante que les défenses cellulaires antioxydantes, un stress oxydatif va être généré. (Désage et al., 2021) Ce stress pourra induire d'importants dégâts sur les cellules comme la fragmentation de l'ADN, la dégradation des protéines et le dysfonctionnement des mitochondries. (Kumar Babele et al., 2021)

La génotoxicité directe des CNT comprend des dégâts occasionnés au niveau de l'ADN causant de l'instabilité génétique et des modifications au niveau de la phosphorylation des protéines kinase menant à l'augmentation de l'expression des oncogènes. (Bibby et al., 2016)

D'autre part, le stress oxydatif induit par les ROS affecte les mitochondries en provoquant une perte d'homéostasie. En effet, la production de ROS aura un impact sur les gènes mitochondriaux puisqu'elle va augmenter l'expression de certains gènes, provoquant des dysfonctionnements au sein des mitochondries qui mènent à la mitophagie. La perte d'homéostasie peut entraîner la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. (Snyder et al., 2019 ; Kumar Babele et al., 2021)

L'exposition aux CNT va générer la production de ROS qui vont induire un stress oxydatif. Le stress oxydatif généré va réduire la viabilité des cellules pulmonaire par la dérégulation des événements épigénétiques et la modification des processus de mort cellulaire. (Kumar Babele et al., 2021)

4.4.2 Inflammation

Dans un second temps, les dégâts cellulaires vont induire une réponse inflammatoire via l'activation des macrophages. Les CNT vont pénétrer dans l'organisme et atteindre le tissu pulmonaire où ils seront phagocytés par les macrophages M1 pro-inflammatoires (Figure 4). Les CNT, souvent trop longs, ne pourront pas être phagocytés entièrement par

les macrophages qui réaliseront une « phagocytose frustrée ». Ces macrophages activés vont libérer des cytokines telles que TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IGF-1, mais aussi de la leptine, des facteurs de croissance (G-CSF) et des protéines de signalisation (VEGF). La libération des cytokines inflammatoires entraîne le recrutement des neutrophiles vers le foyer inflammatoire. Ces neutrophiles inflammatoires vont contribuer à l'inflammation chronique et à l'augmentation des mutations (Lanone et al., 2013). Il a aussi été démontré que suite à l'exposition des certaines fibres telles que l'amiante et les CNT, les macrophages et cellules mésothéliales ou épithéliales provoquent la libération de protéines pro-inflammatoires : HMGB1 (High Mobility Group Box 1). Ces protéines vont déclencher une inflammation chronique et induire l'autophagie au niveau des cellules mésothéliales, favorisant ainsi la survie et la transformation en cellules malignes. (Xue et al, 2020 ; Kumar et Babel, 2021)

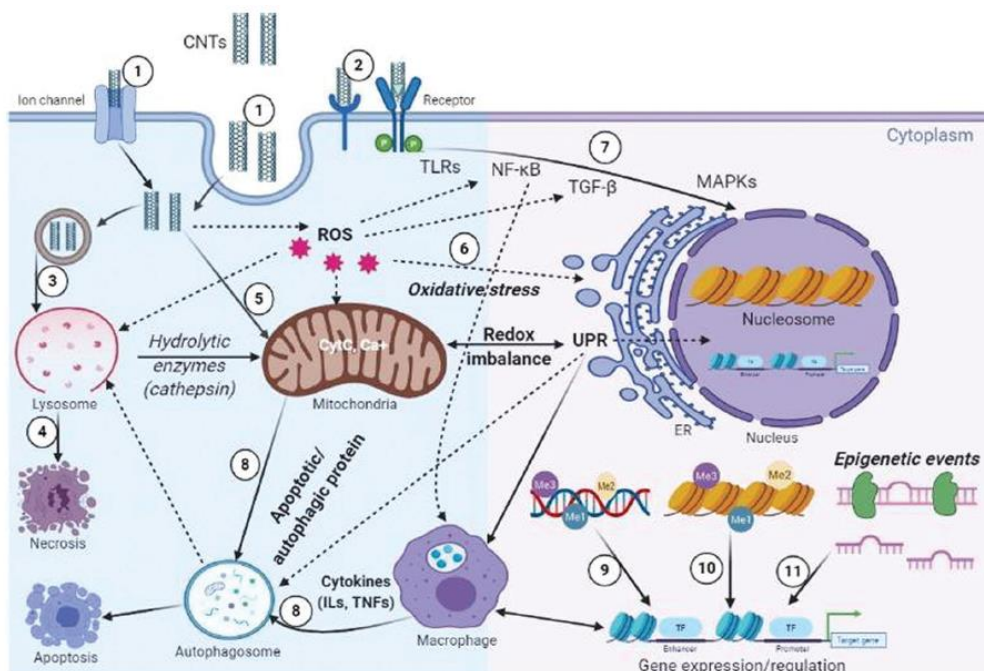


Figure 4 : Mécanismes de cytotoxicité induits par les CNT (Kumar Babel et al., 2021)

(1) Internalisation des CNT par des canaux ioniques et par endocytose, (2, 7) cascades de signalisation déclenchée par les CNT, (3) accumulation des ROS et perméabilisation de la membrane lysosomale, (4) formation d'une nécrose. (5, 6) La perte d'homéostasie induite par les médiateurs effecteurs telles que le stress oxydatif et la perturbation microbienne, (8) entraîne la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Les CNT peuvent induire un stress oxydatif et déréguler les événements épigénétiques tels que (9) la méthylation de l'ADN, (10) la modification d'histone et (11) l'expression des ARNm.

4.4.3 Immunosuppression

En plus des réponses inflammatoires, l'exposition aux CNT va déclencher des réponses immunosuppressives qui contribuent au développement du cancer. Les cellules directement impliquées dans l'immunosuppression sont les LT reg et les macrophages M2. Ces macrophages M2 sont associés aux tumeurs et sont également appelés TAM (Tumor-Associated Macrophages). Les cellules immunosuppressives sont caractérisées par une activité pro-tumorale puisqu'elles vont inhiber les défenses immunitaires de l'organisme pour favoriser le développement de la tumeur. Un microenvironnement immunosuppresseur va se former autour des fibres et déclencher l'immunosuppression. (Huaux et al., 2015) (Désage et al., 2021)

Les TAM vont stimuler l'activité immunosuppressive des LT dans le microenvironnement qui entoure la tumeur. Les macrophages TAM vont libérer des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β qui vont stimuler l'activité des LTreg. Les LTreg vont d'une part, inhiber l'expression des récepteurs CD8+ et bloquer l'activité des LTc. Les LTc ne pourront alors plus éliminer les cellules tumorales via leur activité cytotoxique. D'autre part, les LTreg vont réprimer les LTh qui ne pourront plus assurer la réponse immunitaire adaptative. Les défenses liées à l'immunité innée vont également être impactées par le microenvironnement immunosuppresseur puisque les cellules dendritiques ainsi que les NK seront inhibées, en faveur de la progression tumorale. En effet, les LTreg empêchent aussi l'activité des cellules dendritiques en affectant la reconnaissance antigénique des cellules dendritiques. La libération de cytokines immunosuppressives par les macrophages va donc bloquer un ensemble de réactions qui rendront le microenvironnement propice au développement des cellules tumorales. (Désage et al., 2021) (Mantovani et al., 2017)

Les cellules myéloïdes MDSC sont présentes de manière très abondante à proximité des zones tumorales, dans le cas du développement d'un mésothéliome par exemple (Figure 5). Ce sont des cellules myéloïdes immatures qui ont la capacité de déréguler les réponses immunitaires. Ces cellules vont activer les LTreg et induire la production d'oxyde nitrique et d'arginase. Cela entraîne la perte de fonction des LT CD4+ et CD8+ et contribue donc à l'immunosuppression. D'autres cellules telles que les CAF (Cancer-Associated Fibroblast) constituent le microenvironnement autour du mésothéliome. Ces

cellules vont inhiber l'afflux de LTc et par conséquent favoriser la croissance tumorale. D'autres cellules sont également présentes telles les NK et cellules dendritiques qui sont des cellules antitumorales. Cependant, dans le cas d'une immunosuppression, elles seront beaucoup moins présentes pour laisser la tumeur s'installer. (Minnema-Luiting et al., 2018)

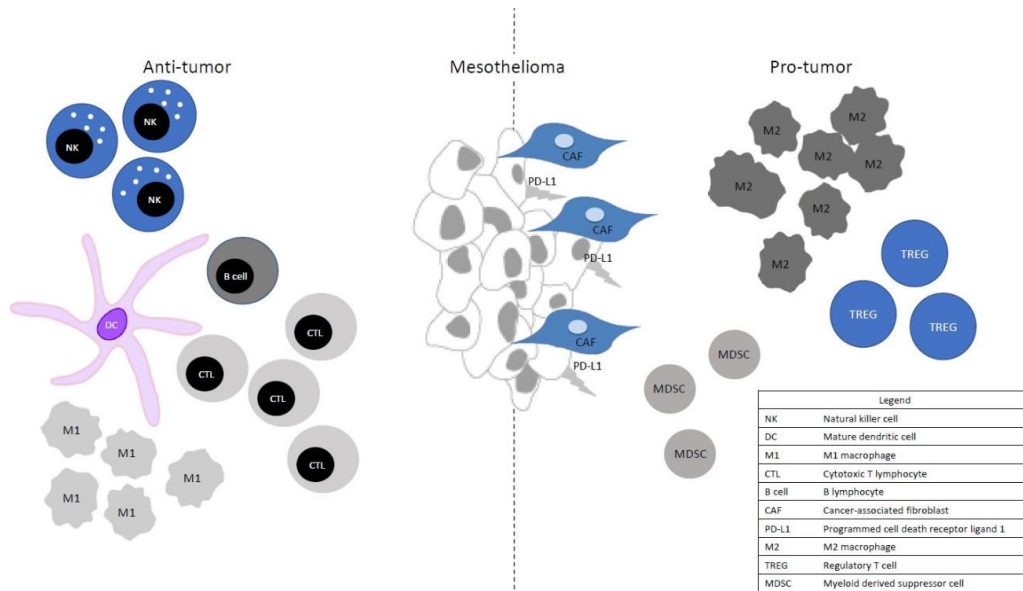


Figure 5 : Mécanisme lié à l'immunosuppression après exposition aux CNT (Minnema-Luiting et al., 2018)

Une étude a montré que, chez certains patients exposés à l'amiante, la production d'IFN- γ antitumorale est diminuée. De même, l'expression du récepteur CXCR3 par les lymphocytes T effecteurs est réduite ce qui limite les réponses immunitaires. Les fibres d'amiantes sont décrites comme étant responsables de l'altération de l'immunité antitumorale. (Maeda et al., 2017)

Tous ces éléments vont intervenir dans l'immunosuppression induite par les fibres et vont favoriser la croissance tumorale. La formation d'un microenvironnement immunosuppresseur permet ainsi à la tumeur d'échapper à la surveillance immunitaire. (Désage et al., 2021)

4.5 Modèles murins de mésothéliome et de cancer pulmonaire

Depuis quelques années, des modèles de mésothéliome et de cancer pulmonaire sont testés sur les animaux, en particulier sur les rats et les souris, afin d'évaluer l'activité cancérigène des CNT. Ces modèles sont importants pour mieux comprendre les mécanismes cytotoxiques induit par les CNT et déterminer les risques pour la santé humaine. (Kumar Babele et al., 2021)

Un modèle de mésothéliome a été induit chez le rat suite à l'exposition des fibres d'amiantes (Bibby et al., 2016) et des CNT-7 (Orsi et al., 2020) via injection intrapéritonéale. Pour les fibres d'amiante comme pour les CNT-7, un effet cancérigène via les réactions inflammatoires et immunosuppressives qu'ils déclenchent a donc été démontré. Cependant, d'autres particules ont également été testées comme les CNT-T et le CB sur le modèle de mésothéliome, et ces fibres n'ont pas montré les mêmes résultats. Les fibres de CNT-T sont peu ou pas cancérigènes et les particules de CB sont peu cancérigènes. (Baan, 2007 ; Muller et al., 2009)

Il est important de distinguer deux types de CNT qui sont souvent utilisés dans les expériences : les CNT-7 en forme d'aiguille et les CNT-T en forme d'enchevêtrement. Des études expérimentales ont démontré que les CNT-7 peuvent déclencher un mésothéliome chez le rat comme les fibres d'amiantes. C'est pourquoi les CNT-7 ont été classés comme possiblement carcinogènes pour l'homme par l'IARC. Concernant les CNT-T, aucun mésothéliome n'a été observé sur les rats lors d'expériences menées sur une durée de 3 ans. Toutes les formes de CNT ne sont pas cancérigènes et n'induisent pas systématiquement le mésothéliome. Le CB est une particule produite par l'industrie de la pétrochimie et est composé uniquement de carbone. Cette particule a été classée par l'IARC comme possiblement cancérigène pour l'Homme même si des études montrent une activité cancérigène très faible. (Baan, 2007 ; IARC, 2012 ; Orsi et al, 2020)

Enfin, de nombreux modèles ont été étudiés chez le rat car la souris est résistante au cancer. Or, la souris est mieux documentée que le rat et beaucoup plus utilisée en science biomédicale. Il est donc intéressant de développer un modèle de cancérogénité chez la souris. De plus, la souris permet de pouvoir faire le choix de se focaliser sur 1 seul gène grâce aux souris B6 knock-out. Les chercheurs ont donc contourné le problème en injectant simultanément des CNT et du méthylcholanthrène, un carcinogène capable de

stimuler l'activité tumorale. Le composé le plus souvent utilisé est le 3MC, car il a un effet cancérigène direct amplifié par les fibres d'amiante/CNT. (Miao et al., 2020)

Une étude (Sargent et al., 2014) a d'ailleurs déjà testé un modèle de cancer pulmonaire chez la souris suite à l'exposition au 3MC + CNT-7. Ils ont réussi après 7 mois d'exposition à obtenir des résultats montrant l'évolution du volume tumorale en fonction du type de traitement. Ils en concluent que le 3MC seul induit l'installation d'une tumeur et que l'exposition aux CNT-7 amplifie le développement du cancer pulmonaire.

5. Objectifs et stratégies

5.1 Objectifs

Le but de ce travail est de développer dans notre laboratoire un modèle murin de cancer pulmonaire induit par des particules pour mieux étudier les réponses immunosuppressives.

Pour réaliser ce modèle, des CNT combinés au 3-méthylcholanthrène (3MC) ont été injectés à deux souches de souris (A/J et B6). Des coupes histologiques permettront d'analyser l'état du tissu ainsi que le stade d'avancement des tumeurs au niveau des poumons.

Ce mémoire a pour objectif de répondre à 3 questions principales :

- Les CNT-7 accentuent-ils l'apparition de lésions tumorales induite grâce au 3MC (expérience 1) ?
- Les CNT sont-ils tous cancérigènes (expérience 2) ?
- Y a-t-il une différence de sensibilité entre les souches de souris A/J et B6 (expérience 3) ?

5.2 Stratégies expérimentales

Nous avons réalisé 3 expériences successives pour étudier l'effet d'une exposition aux CNT chez les souris. Dans la première expérience, les souris A/J ont été traitées au 3MC par injection i.p. et ont ensuite été exposées aux CNT-7 par a.o.p. Cette première expérience a permis de comparer l'effet du 3MC ainsi que celui des CNT-7 sur l'apparition de l'adénocarcinome pulmonaire. Ensuite, lors de la seconde expérience, chez la souris A/J injectée au 3MC, nous avons comparé l'activité cancérigène des CNT-7 (rectilignes) avec celle des CNT-T (courbés) dans les poumons. La troisième et dernière expérience a été réalisée sur une autre souche de souris : les souris B6. En plus des traitements précédents, ces souris ont été exposées au carbon black (CB) considéré comme peu cancérigène. Cette expérience a permis de comparer l'activité cancérigène du CB avec les CNT, ainsi que de comparer l'apparition de cancer pulmonaire chez les souris A/J et B6.

6. Matériels et méthodes

6.1 Exposition des souris aux CNT

6.1.1 Conditions expérimentales

Les animaux utilisés pour les deux expériences sont des souris A/J mâles (Charles River, Massachusetts, USA) et C57BL6 mâles abrégées B6 (Janvier Labs, France), âgées de 5 à 6 semaines. Elles ont été placées dans une animalerie SPF-like (Animalerie Laennec, UCLouvain, Belgique) dans un environnement contrôlé (20-24°C, 50-60% d'humidité, cycle 12h/12h d'éclairage automatique, boisson acidifiée et nourriture d'entretien « Carfil » ad libitum). L'anesthésiant utilisé lors de l'instillation des particules via aspiration oro-pharyngée (a.o.p.) est composé de xylazine (1 ml Rompun 2%, Bayer HealthCare, France), de kétamine (1 ml Nimatek 100 mg/ml, Eurovet, Pays-Bas) et de PBS (18 ml, Phosphate Buffered Saline, Thermo Fisher Scientific, Cat. #14287080). Il est injecté par voie intra-péritonéale (i.p.) à raison de 10 µl/g de souris.

Le 3MC (3-méthylcholanthrène, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) est dissout dans de l'acétate d'éthyle 5% et dilué dans 100 ml d'huile d'olive (Aldi) filtrée. Il est ensuite administré à raison de 250 µg par voie intra-péritonéale. Les particules utilisées sont des CNT-7 (MWCNT-XNRI, Mitsui & co, Japon), des CNT-T (tangled, Nagoya university, Japon) et du CB (Carbon Black, ENSAGO 250G, timcal). Les particules sont chauffées à 200°C pendant 2h, puis soniquées (Sonics, Vibra-cell) dans un bain à ultrasons pendant 15 min. Elles ont ensuite été ajoutées à 50µ L de solution saline avant d'être administrées par aspiration oro-pharyngée. Certaines souris n'ont pas été exposées aux particules par a.o.p. et ont reçu une solution contenant uniquement du NaCl (véhicule, Baxter, 50µl à 0,9%).

L'euthanasiant utilisé est du pentobarbital sodique (60 mg/ml) dont 250 µl est injecté dans le péritoine de chaque souris. Les organes prélevés sont placés dans une solution composée de formaldéhyde (100 ml à 36,5%, F8775) de PBS (100 ml, dilué 10x) et d'eau (800 ml), pendant au moins 48h pour fixer les cellules et les structures. Les poumons des souris mortes au cours de l'expérience n'ont pas été collectés.

6.1.2 Expérience 1 : comparaison 3MC vs CNT-7 chez les A/J

La première expérience a été réalisée sur 21 souris A/J. Brièvement, ces souris ont été pré-traitées au 3MC avant d'être instillées aux CNT-7 ou au véhicule (Tableau 1).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents traitements administrés aux souris A/J lors de l'expérience 1

Groupe	Nombre de souris	3MC	Particules
1	(10-1)	oui	NaCl
2	(11-1)	oui	CNT-7

L'expérience a débuté le 25 septembre 2019 et les souris ont été sacrifiées le 28 juillet 2020, soit 41 semaines après le début de l'expérience (Figure 6). Les souris traitées au 3MC seul ont reçu 4 doses (4 x 50 μ g) de NaCl tandis que les souris traitées au 3MC + CNT-7 ont reçu 4 doses (4 x 100 μ g) de CNT-7. L'instillation du NaCl et des particules de CNT-7 a commencé 1 semaine après avoir administré le 3MC avec un intervalle régulier de 2 semaines entre chaque dose. Une souris A/J de chaque groupe est morte au cours de la semaine 3 comme indiqué dans le Tableau 1.

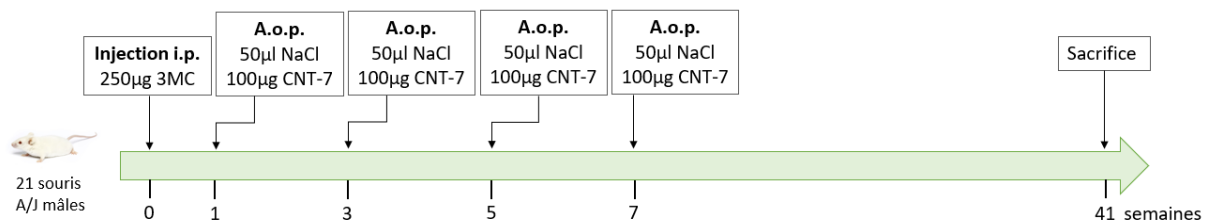


Figure 6 : Plan expérimental de l'expérience de co-carcinogénicité sur les souris A/J exposées aux CNT-7

Pendant toute la durée de l'expérience, le poids de chaque souris a été mesuré une fois par semaine afin d'observer d'éventuelles anomalies. La pesée systématique permet donc un contrôle continu de nos souris. Aucun changement significatif de poids n'a été observée durant les 41 semaines d'expérience. En fin d'expérience, les poumons sont les seuls organes à avoir été collectés.

6.1.3 Expérience 2 : comparaison CNT-T vs CNT-7 chez les A/J

La seconde expérience a été réalisée sur 19 souris A/J. Le premier groupe de souris traitées est le groupe contrôle. Ces souris n'ont pas été exposées aux particules et ont donc reçu le véhicule du 3MC et le véhicule des particules. Les autres souris ont été pré-traitées au 3MC avant d'être instillées aux CNT-7, CNT-T ou au véhicule (Tableau 2).

Tableau 2 : tableau récapitulatif des différents traitements administrés aux souris A/J lors de l'expérience 2

Groupe	Nombre de souris	3MC	Particules
1	4	non	NaCl
2	5	oui	NaCl
3	(5-1)	oui	CNT-7
4	(5-1)	oui	CNT-T

L'expérience a débuté le 17 mars 2021 et le sacrifice des souris a eu lieu le 1^{er} décembre 2021, soit 34 semaines après le début de l'expérience (Figure 7). La durée de l'expérience 2 a été raccourcie par rapport à celle de l'expérience 1 afin de réduire le nombre de tumeurs à quantifier, et ainsi faciliter l'étude histologique des poumons et l'interprétation des résultats. L'exposition aux particules ou du véhicule suit la même chronologie que lors de l'expérience 1. Durant l'expérience 2, deux souris A/J sont décédées avant le sacrifice. Une qui suivait le traitement 3MC + CNT-T est morte en semaine 20 tandis que l'autre, exposée au 3MC + CNT-7, est morte en semaine 28 comme indiqué dans le Tableau 2.

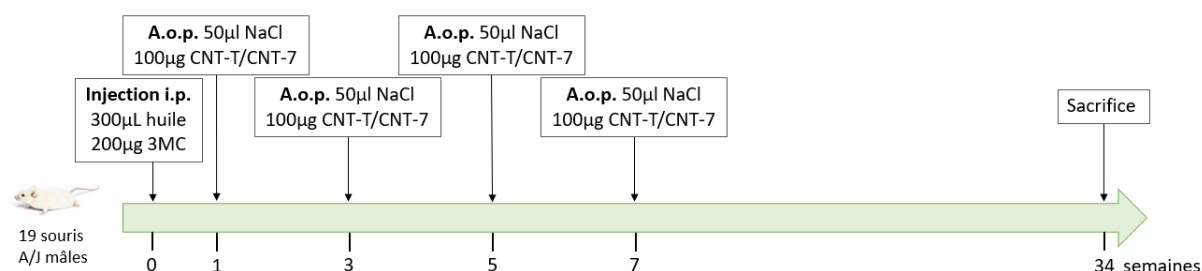


Figure 7 : Plan expérimental de l'expérience de co-carcinogénicité sur les souris A/J exposées aux CNT-7 et aux CNT-T

Au terme de l'expérience 2, le foie et le rein ont également été prélevés afin d'observer la présence de tumeurs dans d'autres organes que les poumons.

6.1.4 Expérience 3 : comparaison CNT-T vs CNT-7 vs CB chez les B6

La 3^{ème} expérience a été réalisée sur 24 souris B6 (C57BL6). Le mode opératoire est identique à celui de la 2^{ème} expérience avec une nouvelle particule introduite : le CB. Le premier groupe est le groupe contrôle, tandis que les autres souris ont été pré-traitées au 3MC avant d'être instillées aux CNT-7, CNT-T, CB ou au véhicule (Tableau 3).

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents traitements administrés aux souris lors de l'expérience 3

Groupe	Nombre de souris	3MC	Particules
1	4	non	NaCl
2	5(-2)	oui	NaCl
3	5(-1)	oui	CNT-7
4	5(-1)	oui	CNT-T
5	5	oui	CB

L'expérience 3 a commencé en même temps que l'expérience 2 à savoir le 17 mars 2021, mais il a été décidé de sacrifier les souris B6 plus tard que les A/J de l'expérience 2, car les B6 sont plus résistantes au développement de tumeurs. Le sacrifice des souris B6 s'est déroulé 6 semaines après celui des A/J, soit 40 semaines après le début de la 3^{ème} expérience (Figure 8). Durant l'expérience 3, 4 souris B6 sont décédées avant le sacrifice : 2 décès dans le groupe 3MC (semaine 14 et semaine 24), 1 dans le groupe 3MC + CNT-7 (semaine 6) et 1 dans le groupe 3MC + CNT-T (semaine 35) comme indiqué dans le Tableau 3.

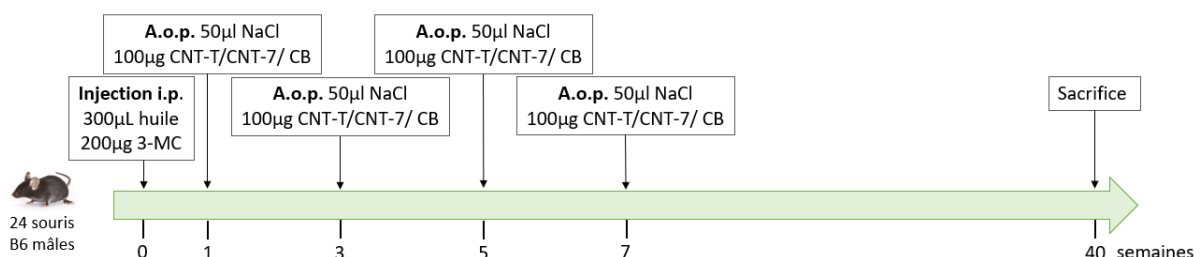


Figure 8 : Plan expérimental de l'expérience de co-carcinogénicité sur les souris B6 exposées aux CNT-7, CNT-T et CB

Comme pour l'expérience 2, les poumons, le foie et le rein ont été prélevés au terme de l'expérience 3.

6.2 Mise en paraffine

La mise en paraffine consiste à remplacer l'eau des organes par de la paraffine afin de fixer les structures cellulaires. Cette étape permet le durcissement de l'organe pour faciliter la découpe.

Pour ce faire, les poumons sont placés dans un automate à inclusion sous vide (Sakura, Tissue-Tek VIP6 AI). L'automate fait passer les organes successivement dans une série de bains contenant des solvants. La première étape est le passage par les bains de méthanol qui vont déshydrater l'organe. Ensuite, un passage dans le toluène, composé miscible dans le méthanol et la paraffine, va remplacer le méthanol dans les organes par désalcoolisation.

L'organe est finalement placé dans un moule entièrement recouvert de paraffine liquide chauffée à 60°C avant d'être refroidie à -4°C et démoulée.

6.3 Coupe des blocs

L'étape suivante est la coupe des blocs de paraffine contenant les poumons afin de pouvoir les visualiser au microscope optique. Pour ce faire, nous utilisons un microtome (Thermo Fisher, semi-automated microtome HM340E) qui permet de réaliser des coupes très fines (5µm d'épaisseur) correspondant à une couche d'une cellule d'épaisseur.

Avant la découpe, les blocs sont refroidis afin d'assurer la solidité de la paraffine. Pour un refroidissement rapide, les blocs sont déposés au préalable sur une plaque froide à -5°C.

L'échantillon va venir s'écraser contre le couteau qui lui est fixé. Les coupes vont s'accumuler et glisser grâce au tapis d'eau qui les conduit directement dans le bain-marie, maintenu à une température de 40°C pour lisser les coupes en effaçant les plis de la coupe. Les coupes sont ensuite prélevées dans le bain-marie et fixées sur une lame en verre grâce à la pression hydrostatique exercée par l'eau sur le verre. Les lames utilisées (Epredia, SuperFrost Plus) ont la particularité d'être chargées positivement. La fixation des coupes tissulaires aux lames est plus facile puisque les tissus chargés négativement vont se coller aux lames par effet d'attraction. La lame est finalement mise à sécher ; 2 lames sont réalisées par échantillon de poumon.

6.4 La coloration

Le type de coloration appliqué sur toutes nos lames est la coloration H&E : hématoxyline et éosine. D'une part, l'hématoxyline est un colorant cationique qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement comme les acides nucléiques. Il va colorer les noyaux en une couleur bleue/violette. D'autre part, l'éosine est un colorant anionique rose qui va se fixer aux éléments cellulaires chargés positivement comme le cytoplasme des cellules (Feldman et Wolfe, 2014). Les coupes sont successivement trempées dans des bains contenant les solvants ou colorants (Figure 9). L'analyse histologique va permettre de distinguer différentes zones au sein des tissus et ainsi, d'identifier plus facilement les zones tumorales.

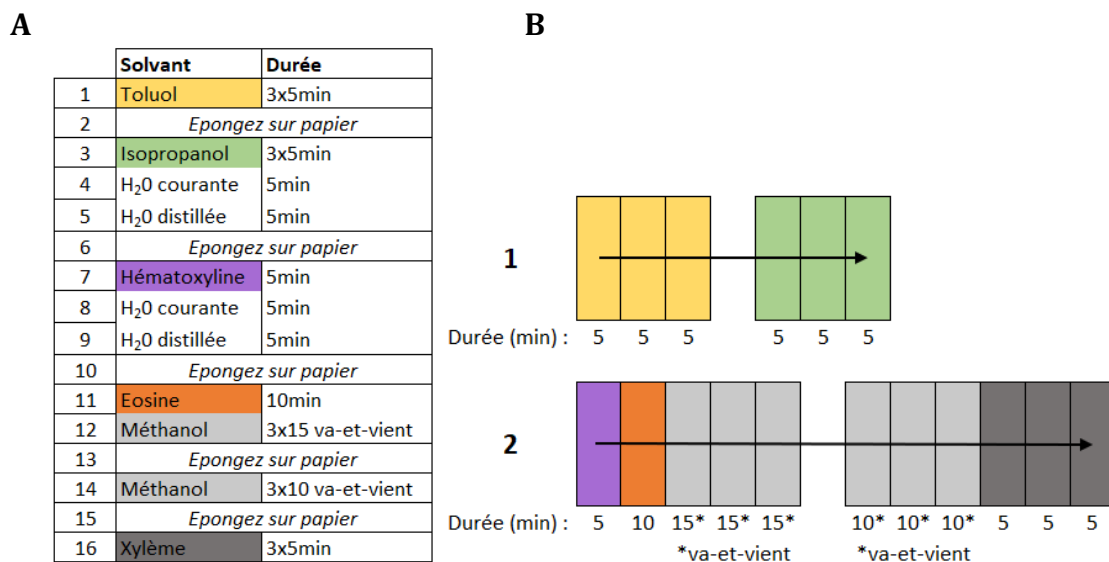


Figure 9 : Protocole de la coloration H&E

(A) Tableau qui reprend les étapes du protocole de la coloration H&E avec la durée de passage dans chaque bain contenant un solvant ou colorant.

(B) Ordre de passage des lames dans les différents bains (1 puis 2) et emplacement des bains. Chaque bain contient un solvant ou colorant repris dans le tableau (A).

D'abord, le toluène va permettre de déparaffiner les coupes grâce à la solubilité de la paraffine avec cet hydrocarbure. Retirer la paraffine permet de garder uniquement le tissu pulmonaire sur les lames. Ensuite, le bain d'isopropanol va éliminer les restes de solvants encore présents sur les lames. (Hinsinger)

La coloration commence par le passage des lames dans le bain d'hématoxyline (Klinipath, réf. VWRK6404/1) qui les imprègne d'une couleur mauve. L'eau courante qui contient du CaCO₃ (solution basique) va réagir avec l'hématoxyline et va faire virer le colorant en bleu-noir. Ensuite, le bain d'éosine (Merck, réf. 1.15936.0025) va colorer les cytoplasmes des cellules dans un ton rose. Les 6 bains de méthanol qui suivent ont pour rôle d'enlever progressivement l'éosine et de déshydrater les cellules. La dernière étape de la coloration est le passage dans 3 bains de xylène utilisé pour éclaircir les lames. (Hinsinger)

Contrairement aux poumons, les reins et foies ont été colorés avec le protocole légèrement modifié, indiqué sur la Figure 10 par des astérisques (*). Ce changement de protocole est dû aux nouveaux colorants hémalum (Clin-Tech, réf. 640401) et éosine (Carl Roth, réf. X883.2) utilisés.

	Solvant	Durée
1	Toluol	3x5min
2	<i>Epongez sur papier</i>	
3	Isopropanol	3x5min
4	H ₂ O courante	5min
5	H ₂ O distillée	5min
6	<i>Epongez sur papier</i>	
7	Hématoxyline*	10min*
8	H ₂ O courante	5min
9	H ₂ O distillée	5min
10	<i>Epongez sur papier</i>	
11	Eosine*	4min*
12	H ₂ O courante	30s*
13	H ₂ O distillée	30s*
14	<i>Laissez sécher à l'air 15min*</i>	

Figure 10 : Nouveau protocole de la coloration H&E

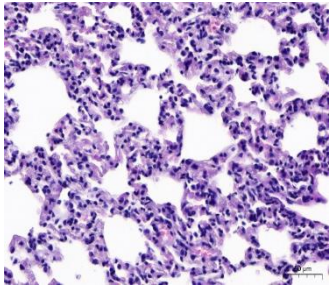
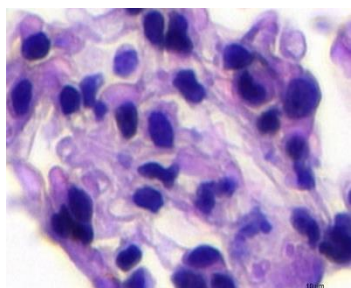
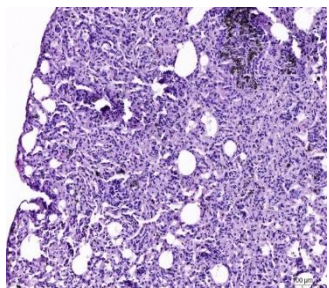
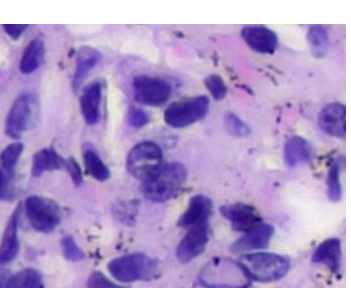
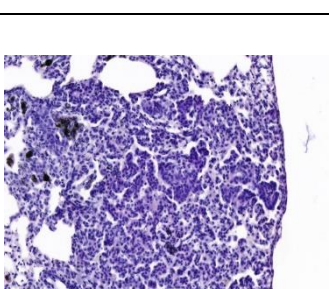
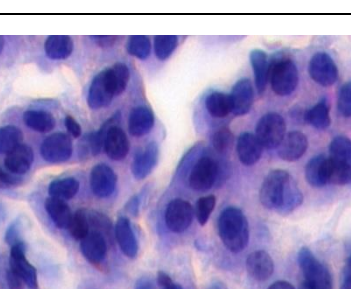
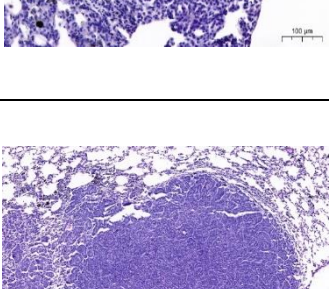
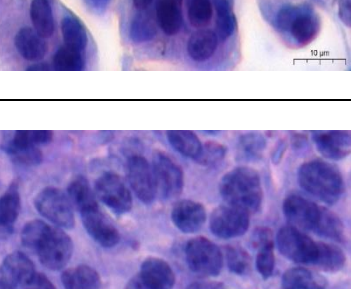
Le montage des lames consiste à déposer un film d'acétate qui recouvre les lames colorées. Cette étape se fait grâce au xylène. C'est pourquoi, les lames passeront par 2 bains de xylène pendant 3 min pour faciliter le collage du film, mais aussi pour terminer la déshydratation des coupes. Le montage des lames permet de protéger les coupes lors des manipulations.

6.5 Analyse qualitative des tumeurs

Cette étape consiste à analyser les zones colorées au microscope afin d'observer d'éventuelles zones tumorales dans les poumons. Le pathologiste Étienne Marbaix spécialiste en cancer pulmonaire, nous a permis d'identifier plusieurs grades de lésion.

Grâce à son expertise, nous sommes parvenus à obtenir un tableau (Tableau 4) qui reprend les différents grades des surfaces d'intérêt, allant du grade 0 (pas de lésion) au grade 3 (adénocarcinome papillaire).

Tableau 4 : Tableau des différents types de lésions dans les tissus pulmonaires

	Type de lésion	Illustrations tissus	Illustrations cellules épithéliales
Grade 0	Pas de lésion		
Grade 1	Dysplasie légère ou dysplasie grade 1		
Grade 2	Dysplasie sévère ou dysplasie grade 2		
Grade 3	Adénocarcinome papillaire		

*Les images des coupes ont été obtenues grâce au scanner 3DHitech ScanII.

Observations Tableau 4 :

Grade 0 : Le tissu est sain, aucune cellule anormale n'est observée. Il y a quelques lymphocytes. Le cytoplasme des cellules épithéliales est rose clair. Les noyaux sont de forme ronde, peu nombreux et relativement homogènes.

Grade 1 : Le tissu est sain, mais de petites zones comportent des macrophages inflammatoires (zones plus foncées). Plusieurs infiltrats inflammatoires sont présents autour des alvéoles, et les cellules y sont un peu plus nombreuses qu'au grade 0. Il y a beaucoup d'espaces vides entre les cellules. La densité cellulaire reste néanmoins faible comparé aux grades supérieurs. Les noyaux des cellules sont hétérogènes et occupent plus de place dans la cellule qu'au grade 0.

Grade 2 : Les zones alvéolaires sont petit à petit remplies de cellules, mais la structure du parenchyme, dont les alvéoles, n'est pas encore détruite. Il n'y a pas encore d'invasion cellulaire dans les alvéoles. Les cellules du tissu sont de plus en plus nombreuses et collées les unes aux autres. La taille des cellules épithéliales augmente. Il y a peu de cytoplasmes par rapport à la taille des noyaux qui sont grands, nombreux et irréguliers. Ils prennent de plus en plus de place dans la cellule.

Grade 3 : Le parenchyme pulmonaire est détruit, la structure des poumons n'est plus reconnaissable. Seule la zone tumorale, ronde, est bien délimitée grâce à sa densité élevée de cellules. Les bronches et les alvéoles sont envahies de cellules tumorales. Les alvéoles au centre de la tumeur sont détruites et celles en périphérie sont étirées avant d'être détruites. La zone est papillaire, caractérisée par l'agencement ordonné des cellules et noyaux. Il y a peu ou plus d'espace vide entre les cellules. Les cytoplasmes des cellules sont de très petite taille comparés aux noyaux, très grands et hétérogènes.

6.6 Analyse quantitative des tumeurs

L'étape suivante est l'analyse quantitative qui va permettre de déterminer la surface occupée par les zones tumorales. Cette étape a été réalisée uniquement sur les poumons grâce au programme d'intelligence artificielle Halo® (Indica Labs) qui va identifier des zones sur les tissus pulmonaires correspondant à chaque grade défini lors de l'analyse qualitative. Afin que le programme puisse analyser les lames de poumon, celles-ci sont toutes scannées (Leica, SCN400) avec un agrandissement fois 20 avant d'être importées dans Halo.

Halo est un programme d'intelligence artificielle qui doit être entraîné à distinguer les différentes zones afin qu'ils puissent les reconnaître par lui-même sur toutes les coupes. Pour ce faire, le tissu pulmonaire va d'abord être délimité. Ensuite, il faut entraîner le logiciel à reconnaître les 4 surfaces d'intérêt sur base du Tableau 4 établi lors de l'analyse qualitative des poumons. Une 5^{ème} surface est également définie pour le logiciel et permet

de retirer les espaces vides correspondant aux bronches et aux vaisseaux sanguins. Les 5 surfaces mentionnées comprennent le tissu sain, la dysplasie de grade 1, la dysplasie de grade 2, l'adénocarcinome papillaire et le « background ». Une fois suffisamment entraîné, le programme est capable de délimiter chaque surface d'intérêt associée à un code couleur spécifique à chaque grade. Le même code couleur est appliqué sur toutes les coupes (Figure 11).

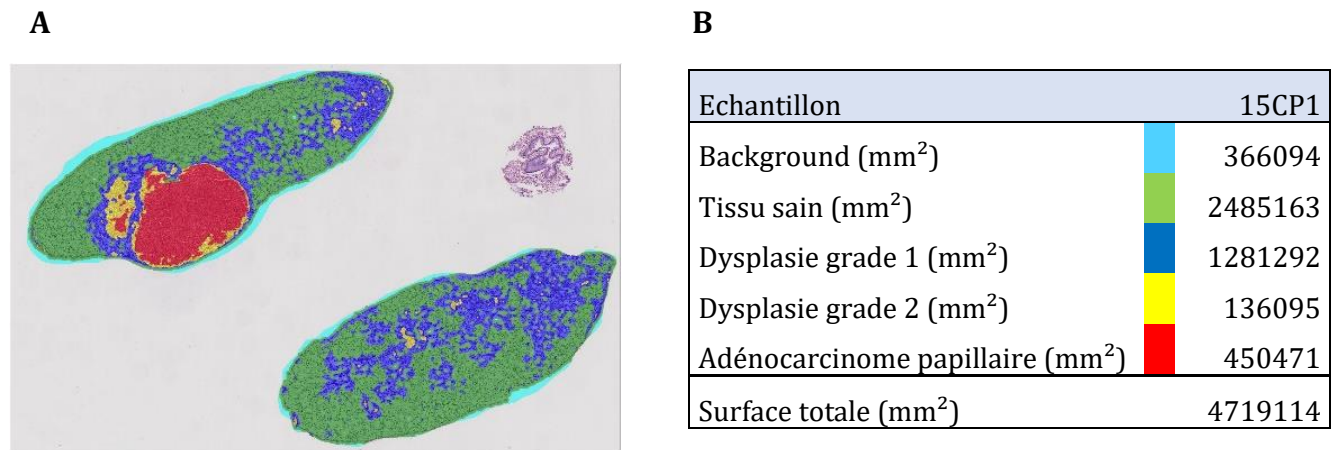


Figure 11 : Échantillon n°15 de l'expérience 1

(A) Image de la coupe après la simulation Halo, (B) tableau produit par Halo qui exprime les différentes surfaces de la coupe exprimées en mm² ainsi que le code couleur utilisé.

Le programme produit une série de données relatives aux différentes surfaces exprimées en mm². Nous avons décidé d'exprimer chaque donnée en fonction de la surface qu'elle occupe par rapport à la surface globale du tissu, en retirant la zone bleu clair dite « background ». Chaque surface d'intérêt est donc exprimée en pourcentage du tissu total. Au total, 4 coupes ont été réalisées sur chaque prélèvement de poumons correspondant à 1 souris. Une moyenne des 4 tableaux pour chaque échantillon a été recalculée afin d'obtenir une surface moyenne pour chaque grade pour chaque échantillon.

Les données ont été représentées sous forme de graphes afin de pouvoir interpréter les résultats. Tous les graphes expriment la surface moyenne de la zone d'intérêt en fonction des échantillons et des traitements. Deux types de graphe ont été réalisés pour chaque expérience. D'une part, les graphes en bâtonnets ont été obtenus grâce à l'outil « Graphpad ». Chaque bâtonnet est obtenu en calculant la moyenne des surfaces pour un même échantillon. Une barre d'erreur représentant la variabilité (déviatoin standard) au sein d'un même échantillon est exprimée sur chaque bâtonnet. Plus la barre est grande,

plus l'écart entre les surfaces observées et la surface moyenne est important. D'autre part, des graphes secteurs ont été réalisés sur Excel.

En ce qui concerne les souris A/J et B6 des groupes uniquement exposés au véhicule (NaCl), aucune lésion tumorale n'a été observée, ce qui a été confirmé par le pathologiste. Cependant, le programme Halo a détecté des zones de dysplasie de grade 1 et 2 au niveau des coupes de poumon des groupes contrôles. Pour cette raison, les résultats des groupes contrôles ne sont pas repris dans les graphes.

7. Résultats

7.1 Effet carcinogénique du 3MC et des CNT-7

Il est connu que le 3MC induit le cancer pulmonaire chez la souris et les CNT-7 augmente son activité cancéreuse (Sargent et al., 2014). Nous avons, dans une première expérience, tenté de reproduire ces résultats. Des souris A/J ont été exposées au 3MC par voie i.p. et à 4 doses de 100 µg de CNT-7 par a.o.p. Les résultats Halo obtenus après l'analyse histologique sont représentés en graphique à la Figure 12.

Nous avons comparé les résultats obtenus pour le 3MC seul ou avec des CNT-7. Le 3MC induit des surfaces de dysplasie (grade 1 et 2) importantes, mais la surface d'adénocarcinome papillaire reste marginale. Les CNT-7 augmentent la surface de dysplasie de grade 1 et d'adénocarcinome papillaire par rapport au 3MC seul. L'exposition aux CNT-7 amplifie donc l'effet pré-cancéreux du 3MC en favorisant l'installation du cancer pulmonaire.

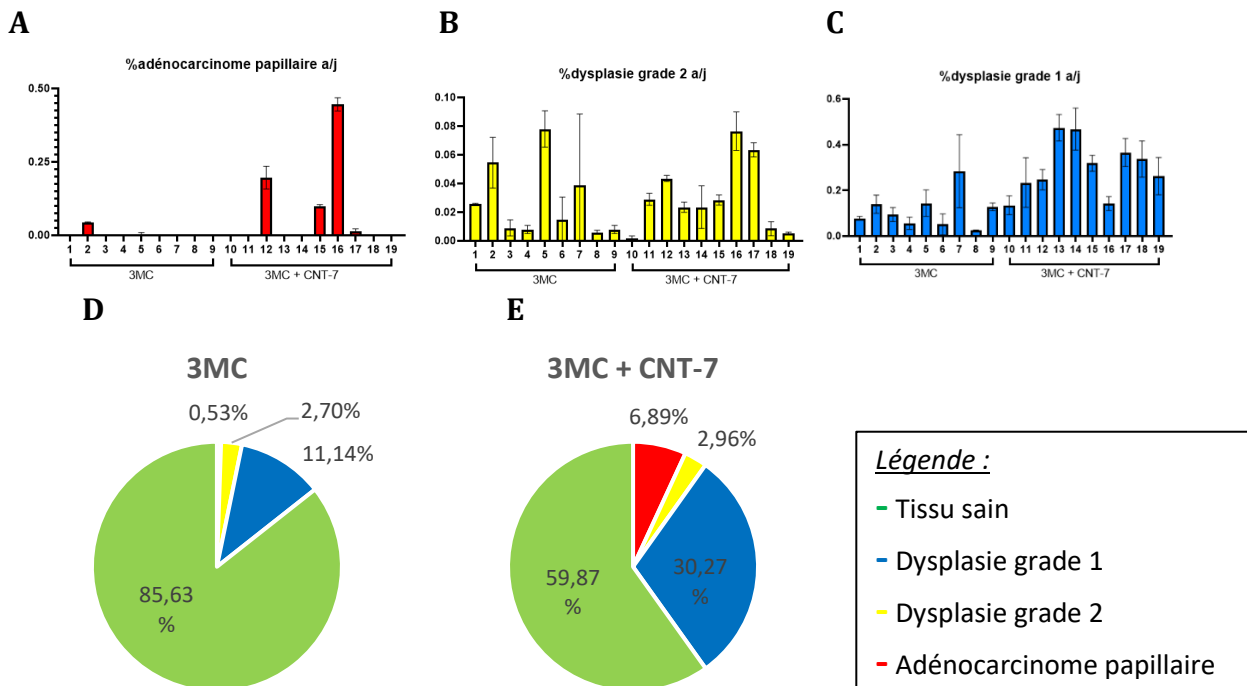


Figure 12 : Effets du 3MC et des CNT-7 sur les tissus pulmonaires

Des souris A/J ont été exposées au 3MC par voie i.p. et un groupe a aussi reçu 4 doses de 100 µg de CNT-7 par a.o.p. Les poumons ont été prélevés 41 semaines après le début de l'expérience. Différentes surfaces exprimées en pourcent ont été mesurées sur ces poumons telles que (A) l'adénocarcinome papillaire, (B) la dysplasie de grade 2 et (C) la dysplasie de grade 1. Des graphes

secteurs qui reprennent les moyennes des surfaces pour chaque traitement ont été réalisés, (D) pour le traitement 3MC seul et (E) pour le traitement 3MC + CNT-7.

7.2 Comparaison des effets carcinogéniques des CNT-T et des CNT-7

Chez le rat, il a été montré que les CNT-7 injectés dans la cavité péritonéale ont un effet carcinogénique plus important que les CNT-T (Bibby et al., 2016). Cependant, dans le poumon, ce sont les CNT-T qui ont un effet cancérigène plus élevé que les CNT-7 (Saleh et al., 2020). Nous avons voulu déterminer si les CNT-T amplifiaient ou pas les effets carcinogéniques du 3MC. Pour ce faire, les souris A/J ont d'abord reçu de l'huile ou du 3MC par i.p. Ensuite, certains groupes ont été exposés à 4 doses de 100 µg de CNT-T ou CNT-7 par a.o.p. afin de comparer l'effet des CNT-T par rapport à celui des CNT-7. Les résultats Halo sont illustrés sous forme de graphes (Figure 13).

Il apparaît que le 3MC seul induit des petites surfaces de dysplasie (grade 1 et 2). Les surfaces d'adénocarcinome papillaire restent très faibles après l'injection le 3MC. En ce qui concerne les traitements des CNT, les CNT-7 instillés avec le 3MC augmentent les surfaces de dysplasie par rapport au 3MC seul. Les CNT-T combinés au 3MC induisent des surfaces d'adénocarcinome papillaire plus grandes que les CNT-7. L'activité cancérigène des CNT-T est donc plus importante que celle des CNT-7 dans notre modèle.

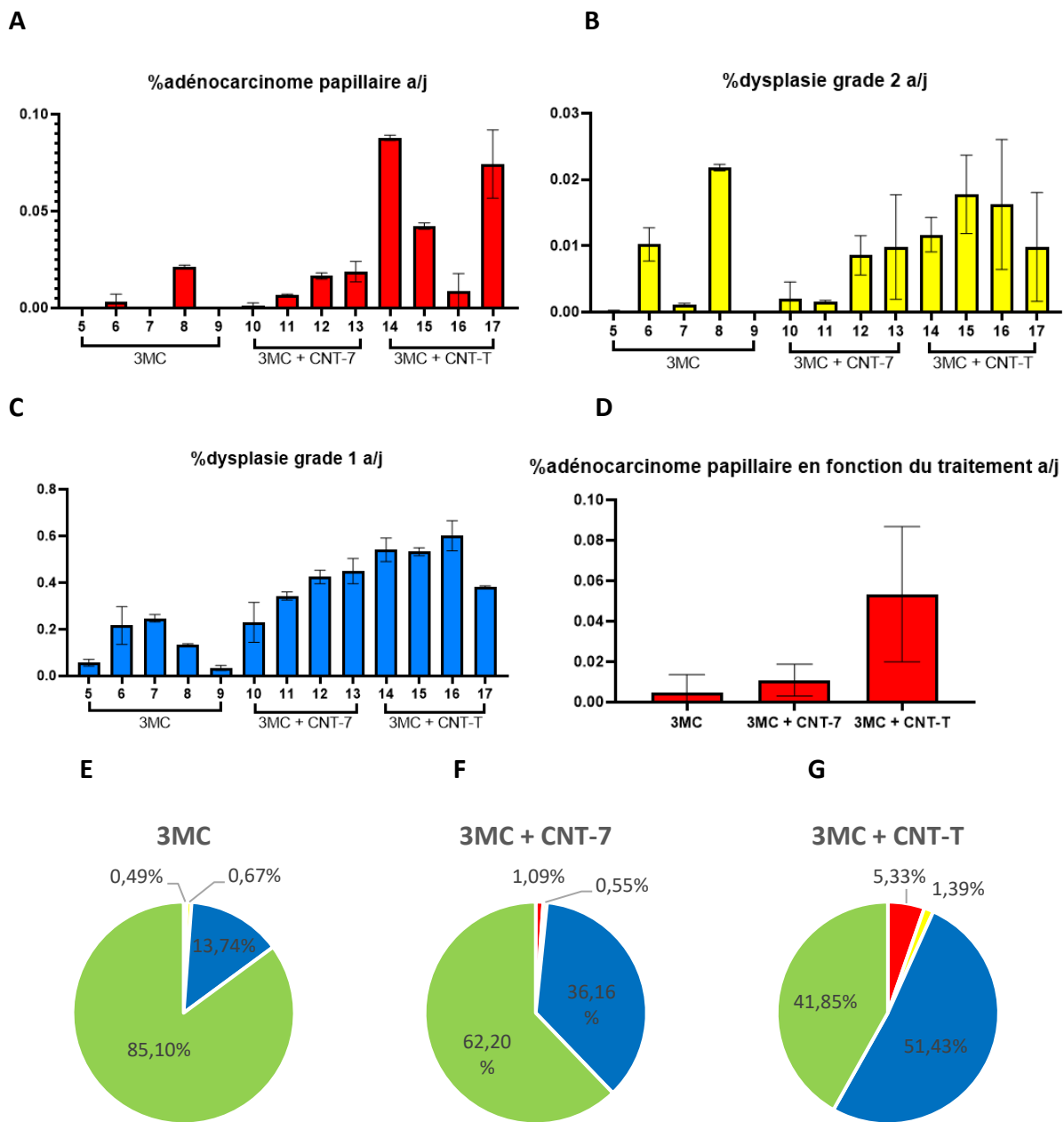


Figure 13 : Effets du 3MC, CNT-T et CNT-7 sur les tissus pulmonaires

Des souris A/J ont été exposées au 3MC par voie i.p., un groupe a aussi reçu 4 doses de 100 µg de CNT-7 par a.o.p. et un dernier groupe a reçu 4 doses de 100 µg de CNT-T par a.o.p. Les poumons ont été prélevés 34 semaines après le début de l'expérience. Les surfaces exprimées en pourcent ont été mesurées sur ces poumons telles que (A) l'adénocarcinome papillaire, (B) la dysplasie de grade 2 et (C) la dysplasie de grade 1. La moyenne de surface d'adénocarcinome pour chaque traitement a aussi été représentée sur le graphe (D). Des graphes secteurs qui reprennent les moyennes des différentes surfaces pour chaque traitement ont été réalisés, (E) pour le traitement 3MC seul, (F) pour le traitement 3MC + CNT-7, et enfin (G) pour le traitement 3MC + CNT-T.

7.3 L'activité des particules de CB

Nous avons dans une dernière expérience voulu tester les effets des CNT-7 et CNT-T dans une autre souche de souris plus largement utilisée en recherche immunologique, les souris de souche B6 (Dominguez-Purano et al., 2008), et étudier une particule composée de carbone mais qui ne possède pas d'activité carcinogénique ; les particules de noir de carbone (Baan, 2007).

Les données de quantification histologique des poumons de cette expérience sont représentées dans la Figure 14 sous forme de graphes. Comme pour l'expérience précédente utilisant des souris A/J, nous avons pu observer que les CNT (CNT-T ou CNT-7) conjointement au traitement 3MC amplifient les lésions tumorales de grade 1,2 et 3 chez la souris B6. Cet effet est particulièrement marqué en considérant l'apparition d'adénocarcinomes papillaires. La combinaison 3MC et CB n'induit pas d'augmentation comparable des lésions de grade 1, 2 ou 3. Ces données confirment donc les éléments de la littérature sur la faible activité carcinogénique du CB. Sur les graphes secteurs, nous observons que les groupes exposés aux CNT-T et CNT-7 ont les surfaces de dysplasie (grade 1 et 2) les plus grandes, montrant une activité pré-cancéreuse plus importante. Les surfaces tissulaires envahies (grade 1, 2 et 3) observées chez les souris B6 sont beaucoup plus petites que pour les souris A/J, en particulier pour le développement de l'adénocarcinome papillaire.

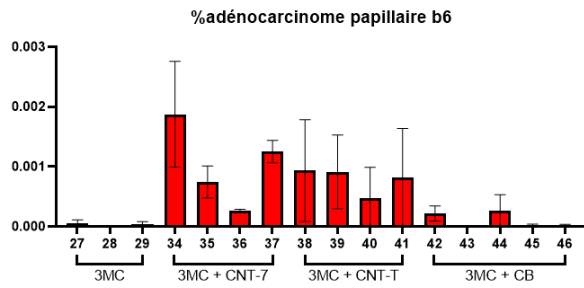
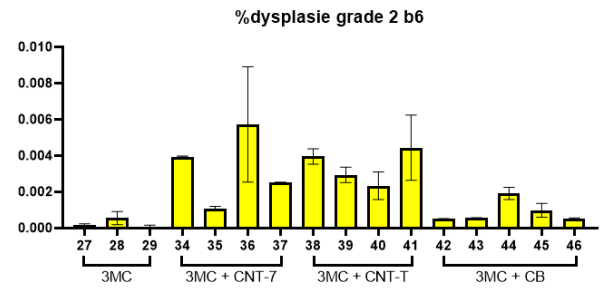
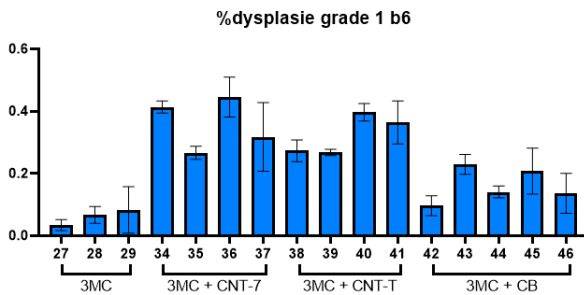
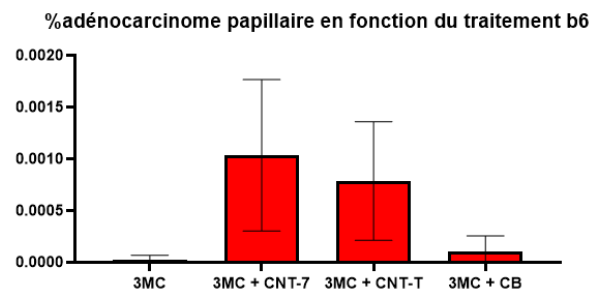
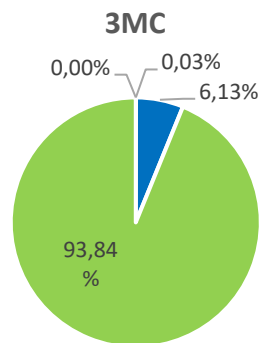
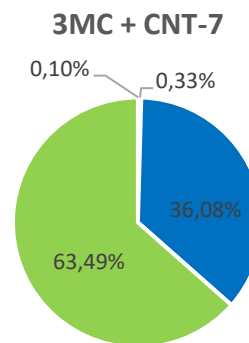
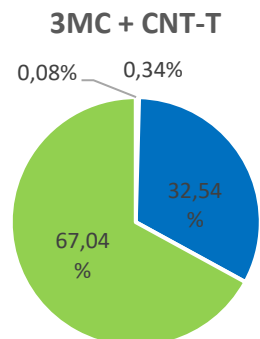
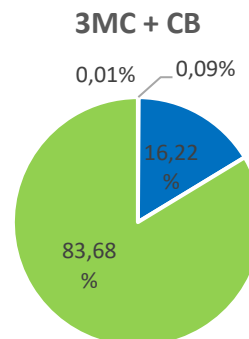
A**B****C****D****E****F****G****H**

Figure 14 : Effets du 3MC, CNT-T, CNT-7 et CB sur les tissus pulmonaires

Des souris B6 ont été exposées au 3MC par voie i.p., un groupe a aussi reçu 4 doses de 100 µg de CNT-7 par a.o.p. et un groupe a reçu 4 doses de 100 µg de CNT-T par a.o.p. et un dernier groupe a reçu 4 doses de 100 µg de CB par a.o.p. Les poumons ont été prélevés 40 semaines après le début de l'expérience. Les surfaces exprimées en pourcent ont été mesurées sur ces poumons telles que (A) l'adénocarcinome papillaire, (B) la dysplasie de grade 2 et (C) la dysplasie de grade 1. La moyenne de surface d'adénocarcinome pour chaque traitement a aussi été représentée dans le graphe (D). Des graphes secteurs qui reprennent les moyennes des différentes surfaces pour chaque traitement ont été réalisés, (E) pour le traitement 3MC seul, (F) pour le traitement 3MC + CNT-7, (G) pour le traitement 3MC + CNT-T, et enfin (H) pour le traitement 3MC + CB.

7.4 Analyse histologique du foie et des reins

Le foie et les reins ont également été prélevés sur les souris A/J de l'expérience 2 et les souris B6 de l'expérience 3. L'analyse qualitative réalisée avec Étienne Marbaix a montré l'absence de zones cancéreuses au niveau des tissus hépatiques et rénaux après le traitement au 3MC ou aux particules. Des petits foyers de nécroses au niveau des cellules hépatiques ont néanmoins été observés, mais ce phénomène est très localisé et ne peut pas être associé à une zone tumorale. De plus, aucune particule n'a été transloquée dans les organes périphériques.

8. Conclusion générale

Sur base des résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire, nous avons pu montrer que l'exposition aux CNT-7 amplifient le cancer pulmonaire induit par le 3-méthylcholanthrène. De plus, les CNT-T ont une activité cancérigène plus élevée que les CNT-7 quand ils sont injectés dans les voies respiratoires. Le Carbon Black (CB) ne semble pas favoriser le développement du cancer pulmonaire. Il s'avère aussi que les souris de souche B6 sont plus résistantes à l'apparition d'un cancer pulmonaire que les souris de souche A/J.

Les résultats obtenus dans notre modèle sont donc en accord avec les études déjà publiées sur les particules de carbone et leur génotoxicité.

9. Discussion

L'objectif principal de cette étude est de développer un modèle de cancer pulmonaire chez la souris à l'aide de CNT. Plusieurs particules ont été utilisées en combinaison du 3MC injecté par voie intra-péritonéale. Une exposition aigüe au 3MC a des effets carcinogéniques en stimulant la libération de médiateurs inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β et l'IFN- γ . (Miao et al., 2020)

Les résultats de notre étude montrent que le 3MC induit des zones de grade 1 et 2, mais très peu d'adénocarcinomes papillaires. L'activité cancéreuse du 3MC est nettement amplifiée par la présence de CNT, particulièrement la forme infiltrante et envahissante définie par l'adénocarcinome papillaire.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux de l'étude de Sargent et al., 2014 qui a été réalisée sur la souris B6C3F1. Durant l'expérience, les souris ont été exposées au 3MC et aux CNT-7 et sacrifiées après 17 mois. Les chercheurs ont alors observé des modifications cellulaires telles qu'une hyperplasie épithéliale ainsi que des atypies cellulaires au niveau des cellules qui tapissent le tissu pulmonaire. L'étude a par la suite montré que l'incidence d'hyperplasie adénomateuse est plus élevée chez les souris exposées au 3MC et aux CNT-7 que chez les souris exposées uniquement au 3MC ou aux CNT-7. La combinaison du 3MC avec les particules de CNT-7 augmente donc le volume tumoral comme dans notre étude.

Nous avons pu montrer que les CNT-T ont une activité cancérogène plus élevée que les CNT-7 chez les souris A/J. En effet, tous les grades, pré-cancéreux et cancéreux sont augmentés par l'instillation de CNT-T. La différence est encore plus marquée au niveau de la surface d'adénocarcinome papillaire qui est beaucoup plus importante suite à l'exposition aux CNT-T comparativement à de l'exposition aux CNT-7.

Plusieurs études ont déjà comparé l'activité cancérogène des CNT-T et les CNT-7 injectés dans la cavité péritonéale de rats (Muller et al., 2009 ; Nagai et al., 2011 ; Rittinghausen et al., 2014 ; Sakamoto et al., 2018 ; Orsi et al., 2021). Ces études ont démontré que les CNT-7 induisent le développement d'un mésothéliome péritonéal tandis que les CNT-T ne déclenchent pas de mésothéliome. Dans ce modèle chez le rat, les CNT-7 sont donc cancérogènes tandis que les CNT-T sont non cancérogènes.

Une autre étude également chez le rat (Saleh et al., 2020) a comparé l'activité pulmonaire des CNT-T avec celle des CNT-7. Les résultats montrent le développement d'un cancer

bronchique induit par les CNT-T. Les CNT-T ont donc une activité cancérigène plus élevée que les CNT-7 lorsqu'ils sont instillés chez le rat. L'étude de Saleh et al. rejoint donc nos résultats et confirme l'hypothèse selon laquelle l'activité génotoxique des CNT-T est plus élevée que celle des CNT-7 dans le modèle de développement du cancer pulmonaire chez les souris A/J.

Les souris de type B6 développent des surfaces d'adénocarcinomes papillaires beaucoup moins importantes que les souris A/J. Elles ont pourtant reçu la même quantité de particules et, ont une durée d'exposition aux particules plus longue que les souris A/J. Une étude (Dominguez-Punaro et al., 2008) réalisée en 2008 a comparé la réponse des A/J et des B6 à une infection par *Streptococcus*. L'infection bactérienne mène à des réponses inflammatoires via la libération de médiateurs pro-inflammatoires. Les résultats montrent une meilleure survie des souris B6 comparativement aux souris A/J qui décèdent toutes après 1 jour d'infection. Les souris B6 maintiennent un meilleur équilibre entre les médiateurs pro- et anti-inflammatoires ; équilibre qui s'avère crucial pour la survie. La sensibilité des souris A/J aux CNT pourrait être liée à des réponses inflammatoires et génotoxiques plus importantes. Par contre, un meilleur contrôle de l'inflammation chez les souris B6 pourrait conduire au développement moins important d'adénocarcinomes papillaires.

Le traitement conjoint de 3MC et de CB n'induit pas de lésions cancéreuses augmentées comparativement aux surfaces lésionnelles induites par les CNT. Par conséquent, l'activité cancérigène du CB est nettement plus faible que celle des CNT. Dans l'ensemble, peu d'études ont évalué l'effet des particules de CB chez les souris ; seules quelques expériences conduisent aux mêmes conclusions que l'étude faite en 2007. Cette étude de Baan (Baan, 2007) révèle quelques cas de tumeurs malignes dans les poumons de souris suite à l'instillation de CB.

9.1 Perspectives

Premièrement, des prélèvements de plasma et de liquide broncho-alvéolaire (BAL) ont aussi été réalisés chez les souris A/J et B6 pendant les expériences. Ces prélèvements peuvent être utilisés afin de doser la présence de médiateurs inflammatoires et

immunosuppresseurs. Nous pourrions ainsi savoir si l'effet potentiateur des CNT est lié à leur capacité à induire de l'inflammation ou un environnement immunosuppresseur.

Ensuite, une étude (He et al., 2011) a montré des cas de fibrose pulmonaire après une courte durée d'exposition (7 jours) aux CNT chez la souris. En histologie, la fibrose pulmonaire est détectée grâce à la coloration Red Sirius. Le Red Sirius est un colorant acide hydrophile qui va se fixer aux fibres de collagène basiques pour les colorer en rouge. En effet, une teneur importante en fibres de collagène dans les tissus peut être associée à de la fibrose pulmonaire, qui n'est pas visible avec la coloration H&E (Rittié, 2017). Nous pourrions donc réaliser cette coloration afin de détecter la présence de fibrose pulmonaire chez nos souris.

Nous n'avons pas noté de lésion tumorale dans les groupes contrôles (sans traitement aux particules ni au 3MC, données non montrées). Ces observations ont été confirmées par un pathologiste. Cependant, le programme a détecté des zones de dysplasie de grade 1 et 2 au niveau des poumons chez les souris A/J et B6. Il peut donc être intéressant de garder les mêmes coupes afin d'entraîner davantage le programme Halo, ou alors recommencer les mesures avec un nouveau scanner (3DHistech ScanII) qui semble avoir une meilleure résolution.

Il serait aussi intéressant de tester les effets des particules seules (sans 3MC) afin de comparer l'activité cancérigène individuelle des particules (CNT-7, CNT-T, CB). Cette étude nous paraît indispensable pour interpréter correctement nos résultats.

10. Bibliographie

- (Aschberger et al., 2010) Aschberger, Karin, Helinor J. Johnston, Vicki Stone, Robert J. Aitken, Steven M. Hankin, Sheona A. K. Peters, C. Lang Tran, et Frans M. Christensen. « Review of Carbon Nanotubes Toxicity and Exposure—Appraisal of Human Health Risk Assessment Based on Open Literature ». *Critical Reviews in Toxicology* 40, n° 9 (octobre 2010): 759-90. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.506638>.
- (Baan, 2007) Baan, Robert A. « Carcinogenic Hazards from Inhaled Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc Not Containing Asbestos or Asbestiform Fibers: Recent Evaluations by an IARC Monographs Working Group ». *Inhalation Toxicology* 19, n° sup1 (janvier 2007): 213-28. <https://doi.org/10.1080/08958370701497903>.
- (Bade et Dela Cruz, 2020) Bade, Brett C., et Charles S. Dela Cruz. « Lung Cancer 2020 ». *Clinics in Chest Medicine* 41, n° 1 (mars 2020): 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>.
- (Belade et al., 2015) Belade, Esther, Sandra Chrusciel, Lucie Armand, Angélique Simon-Deckers, Cyrill Bussy, Philippe Caramelle, Jean-Marie Gagliolo, et al. « The Role of P53 in Lung Macrophages Following Exposure to a Panel of Manufactured Nanomaterials ». *Archives of Toxicology* 89, n° 9 (septembre 2015): 1543-56. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1324-5>.
- (Belgian Cancer Registry) Belgian Cancer Registry. « Session 4 2020 : Adénocarcinomes pulmonaires nouvelles directives ». 18/06/2020. https://kankerregister.org/media/docs/Opleiding/2020_BCRLivead%C3%A9nocarcinomesdupoumon-nouvellesdirectives.pdf?fbclid=IwAR0_KIV6dL58XfLWLw07LPk-fTrXk9BigsM1r9ZlKgkIK4YWj_UbcGQgfkK
- (Bibby et al., 2016) Bibby, Anna C., Selina Tsim, Nikolaos Kanellakis, Hannah Ball, Denis C. Talbot, Kevin G. Blyth, Nick A. Maskell, et Ioannis Psallidas. « Malignant Pleural Mesothelioma: An Update on Investigation, Diagnosis and Treatment ». *European Respiratory Review* 25, n° 142 (1 décembre 2016): 472-86. <https://doi.org/10.1183/16000617.0063-2016>.
- (Bray et al., 2018) Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, et Ahmedin Jemal. « Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, n° 6 (novembre 2018): 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- (Cancer Fact Sheet) “Cancer Fact Sheet: Mesothelioma”. Belgian Cancer Registry, Belgium, 2019. https://kankerregister.org/media/docs/CancerFactSheets/2019/Cancer_Fact_Sheet_Mesothelioma_2019.pdf
- (Cheng et al., 2009) Cheng, Crystal, Karin H. Müller, Krzysztof K.K. Koziol, Jeremy N. Skepper, Paul A. Midgley, Mark E. Welland, et Alexandra E. Porter. « Toxicity and Imaging of Multi-Walled Carbon Nanotubes in Human Macrophage Cells ». *Biomaterials* 30, n° 25 (septembre 2009): 4152-60. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.019>.

- (Cheng et al., 2020) Cheng, Yuen Yee, Emma M Rath, Anthony Linton, Man Lee Yuen, Ken Takahashi, et Kenneth Lee. « The Current Understanding Of Asbestos-Induced Epigenetic Changes Associated With Lung Cancer ». *Lung Cancer: Targets and Therapy* Volume 11 (janvier 2020): 1-11. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S186843>.
- (Désage et al., 2021) Désage, Anne-Laure, Georgia Karpathiou, Michel Peoc'h, et Marios E. Froudarakis. « The Immune Microenvironment of Malignant Pleural Mesothelioma: A Literature Review ». *Cancers* 13, n° 13 (26 juin 2021): 3205. <https://doi.org/10.3390/cancers13133205>.
- (Do et al., 2021) Do, Nhuan Thi, Suho Kim, Minjeong Kwak, Tae Geol Lee, Dong-Gyu Jo, Sang-Won Lee, et Se-Hwa Kim. « Length Difference of Multi-walled Carbon Nanotubes Generates Differential Cytotoxic Responses ». *Journal of Applied Toxicology* 41, n° 9 (septembre 2021): 1414-24. <https://doi.org/10.1002/jat.4132>.
- (Dominguez-Purano et al., 2008) Domínguez-Punaro, María de la Cruz, Mariela Segura, Danuta Radzioch, Serge Rivest, et Marcelo Gottschalk. « Comparison of the Susceptibilities of C57BL/6 and A/J Mouse Strains to *Streptococcus Suis* Serotype 2 Infection ». *Infection and Immunity* 76, n° 9 (septembre 2008): 3901-10. <https://doi.org/10.1128/IAI.00350-08>.
- (Donaldson et al., 2013) Donaldson, Ken, Craig A. Poland, Fiona A. Murphy, Marion MacFarlane, Tatyana Chernova, et Anja Schinwald. « Pulmonary Toxicity of Carbon Nanotubes and Asbestos — Similarities and Differences ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, n° 15 (décembre 2013): 2078-86. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.014>.
- (Dong, 2020) Dong, Jie. « Signaling Pathways Implicated in Carbon Nanotube-Induced Lung Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 11 (11 décembre 2020): 552613. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.552613>.
- (Dong et Ma, 2019) Dong, Jie, et Qiang Ma. « Integration of Inflammation, Fibrosis, and Cancer Induced by Carbon Nanotubes ». *Nanotoxicology* 13, n° 9 (21 octobre 2019): 1244-74. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1651920>.
- (Elgrabli et Lacroix, 2009) Dan Elgrabli, Ghislaine Lacroix. Toxicité des nanoparticules : cas des nanotubes de carbone. 8. Congrès International pluridisciplinaire QUALITA 2009, Mar 2009, Besançon, France. pp.NC. ineris-00973334
- (Feldman et Wolfe, 2014) Feldman, Ada T, et Delia Wolfe. « Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining », 2014, New-York, s. d., 13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3
- (Fenoglio et al., 2008) Fenoglio, Ivana, Giovanna Greco, Maura Tomatis, Julie Muller, Encarnacion Raymundo-Piñero, François Béguin, Antonio Fonseca, Janos B. Nagy, Dominique Lison, et Bice Fubini. « Structural Defects Play a Major Role in the Acute Lung Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes: Physicochemical Aspects ». *Chemical Research in Toxicology* 21, n° 9 (15 septembre 2008): 1690-97. <https://doi.org/10.1021/tx800100s>.

- (Grosse et al., 2014) Grosse, Yann, Dana Loomis, Kathryn Z Guyton, Béatrice Lauby-Secretan, Fatiha El Ghissassi, Véronique Bouvard, Lamia Benbrahim-Tallaa, et al. « Carcinogenicity of Fluoro-Edenite, Silicon Carbide Fibres and Whiskers, and Carbon Nanotubes ». *The Lancet Oncology* 15, n° 13 (décembre 2014): 1427-28.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71109-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71109-X).
- (He et al., 2011) He, Xiaoqing, Shih-Houng Young, Diane Schwegler-Berry, William P. Chisholm, Joseph E. Fernback, et Qiang Ma. « Multiwalled Carbon Nanotubes Induce a Fibrogenic Response by Stimulating Reactive Oxygen Species Production, Activating NF- κ B Signaling, and Promoting Fibroblast-to-Myofibroblast Transformation ». *Chemical Research in Toxicology* 24, n° 12 (19 décembre 2011): 2237-48.
<https://doi.org/10.1021/tx200351d>.
- (Hinsinger) Hinsinger, Julie. « Les colorations histologiques : colorations de routine et colorations spéciales », s. d., 48. <http://www.u999.universite-paris-saclay.fr/images/stories/PDF/protocoles/Les%20colorations%20histologiques.pdf>
- (Huaux et al., 2015) Huaux, François, Virginie d'Ursel de Bousies, Marie-Astrid Parent, Micaela Orsi, Francine Uwambayinema, Raynal Devosse, Saloua Ibouaadaten, et al. « Mesothelioma Response to Carbon Nanotubes Is Associated with an Early and Selective Accumulation of Immunosuppressive Monocytic Cells ». *Particle and Fibre Toxicology* 13, n° 1 (décembre 2015): 46. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0158-0>.
- (Hutchinson et al., 2019) Hutchinson, Barry D., Girish S. Shroff, Mylene T. Truong, et Jane P. Ko. « Spectrum of Lung Adenocarcinoma ». *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* 40, n° 3 (juin 2019): 255-64. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2018.11.009>.
- (IARC, 2012) Centre international de recherche sur le cancer, éd. *A Review of Human Carcinogens*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 100. Lyon: International agency for research on cancer, 2012.
- (INRS) « Amiante. Effets sur la santé - Risques - INRS ». Consulté le 7 avril 2022.
<https://www.inrs.fr/risques/amiante/effets-sante.html>.
- (Jaurand et al., 2009) Jaurand, Marie-Claude F, Annie Renier, et Julien Daubriac. « Mesothelioma: Do Asbestos and Carbon Nanotubes Pose the Same Health Risk? » *Particle and Fibre Toxicology* 6, n° 1 (2009): 16. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-16>.
- (Kumar Babele et al., 2021) Kumar Babele, Piyooosh, Mahendra Kumar Verma, et Ravi Kant Bhatia. « Carbon Nanotubes: A Review on Risks Assessment, Mechanism of Toxicity and Future Directives to Prevent Health Implication ». *BIOCELL* 45, n° 2 (2021): 267-79.
<https://doi.org/10.32604/biocell.2021.013409>.
- (Lanone et al., 2013) Lanone, Sophie, Pascal Andujar, Ali Kermanizadeh, et Jorge Boczkowski. « Determinants of Carbon Nanotube Toxicity ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, n° 15 (décembre 2013): 2063-69.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.019>.
- (Lee et al., 2019) Lee, Kuen-Chan, Pei-Ying Lo, Guang-Yu Lee, Jia-Huei Zheng, et Er-Chieh Cho. « Carboxylated Carbon Nanomaterials in Cell Cycle and Apoptotic Cell Death Regulation ». *Journal of Biotechnology* 296 (avril 2019): 14-21.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.02.005>.

- (Maeda et al., 2017) Maeda, Megumi, Ying Chen, Suni Lee, Naoko Kumagai-Takei, Kei Yoshitome, Hidenori Matsuzaki, Shoko Yamamoto, et al. « Induction of IL-17 Production from Human Peripheral Blood CD4+ Cells by Asbestos Exposure ». *International Journal of Oncology* 50, n° 6 (juin 2017): 2024-32. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3991>.
- (Maddox et al., 2008) Maddox, Catherine, Bingxuan Wang, Patricia A. Kirby, Kai Wang, et Gabriele Ludewig. « Mutagenicity of 3-Methylcholanthrene, PCB3, and 4-OH-PCB3 in the Lung of Transgenic BigBlue® Rats ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25, n° 2 (mars 2008): 260-66. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.10.021>.
- (Mansuet-Lupo, 2018) Mansuet-Lupo, A. « Le cancer pulmonaire anatomo-pathologie ». Université Paris Descartes, janvier 2018. http://des-pneumo.org/wp-content/uploads/2018/02/cancer_histo.pdf?fbclid=IwAR1jU5060djxEzuqYT7A_BCF4i7Qoec8EW6SyCQ8WEfUxZDIcLD4OTzGz6I
- (Mantovani et al., 2017) Mantovani, Alberto, Federica Marchesi, Alberto Malesci, Luigi Laghi, et Paola Allavena. « Tumour-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 14, n° 7 (juillet 2017): 399-416. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217>.
- (Miao et al., 2020) Miao, Wenyu, Zhengwei Fu, et Yuanxiang Jin. « 3-Methylcholanthrene Alters the Hepatic Immune Response in Mice ». *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 52, n° 5 (26 mai 2020): 570-72. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa020>.
- (Minnema-Luiting et al., 2018) Minnema-Luiting, Jorien, Heleen Vroman, Joachim Aerts, et Robin Cornelissen. « Heterogeneity in Immune Cell Content in Malignant Pleural Mesothelioma ». *International Journal of Molecular Sciences* 19, n° 4 (30 mars 2018): 1041. <https://doi.org/10.3390/ijms19041041>.
- (Muller et al., 2009) Muller, Julie, Monique Delos, Nadtha Panin, Virginie Rabolli, François Huaux, et Dominique Lison. « Absence of Carcinogenic Response to Multiwall Carbon Nanotubes in a 2-Year Bioassay in the Peritoneal Cavity of the Rat ». *Toxicological Sciences* 110, n° 2 (août 2009): 442-48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp100>.
- (Nagai et al., 2011) Nagai, H., Y. Okazaki, S. H. Chew, N. Misawa, Y. Yamashita, S. Akatsuka, T. Ishihara, et al. « Diameter and Rigidity of Multiwalled Carbon Nanotubes Are Critical Factors in Mesothelial Injury and Carcinogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, n° 49 (6 décembre 2011): E1330-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110013108>.
- (Nasim et al., 2019) Nasim, Faria, Bruce F. Sabath, et George A. Eapen. « Lung Cancer ». *Medical Clinics of North America* 103, n° 3 (mai 2019): 463-73. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.006>.
- (Negri et al., 2020) Negri, Viviana, Jesús Pacheco-Torres, Daniel Calle, et Pilar López-Larrubia. « Carbon Nanotubes in Biomedicine ». *Topics in Current Chemistry* 378, n° 1 (février 2020): 15. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0278-8>.
- (Orsi et al., 2021) Orsi, Micaela, Mihaly Palmay-Pallag, Yousof Yakoub, Saloua Ibouaadataen, Michèle De Beukelaer, Caroline Bouzin, Bertrand Bearzatto, et al. « Monocytic Ontogeny of Regenerated Macrophages Characterizes the Mesotheliomagenic Responses to Carbon Nanotubes ». *Frontiers in Immunology* 12 (14 juin 2021): 666107. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.666107>.

- (Pacchini, 2009) Pacchini, Sébastien. « Etude des potentialités des nanotubes de carbone dans le domaine hyperfréquence: Application à l'élaboration de matériaux nanocomposites et contribution à la miniaturisation de composants électromécaniques (NEMS) », s. d., 172.
- (Pairon et al., 2013) Pairon, Jean-Claude, François Laurent, Mickaël Rinaldo, Bénédicte Clin, Pascal Andujar, Jacques Ameille, Patrick Brochard, et al. « Pleural Plaques and the Risk of Pleural Mesothelioma ». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 105, n° 4 (20 février 2013): 293-301. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs513>.
- (Périé, 2011) Périé, Thomas. « Dispersion de nanotubes de carbone dans les polymères : de la nanostructuration aux composites hautes performances ». Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. ffpastel-00634552f
- (Poland et al., 2008) Poland, Craig A., Rodger Duffin, Ian Kinloch, Andrew Maynard, William A. H. Wallace, Anthony Seaton, Vicki Stone, Simon Brown, William MacNee, et Ken Donaldson. « Carbon Nanotubes Introduced into the Abdominal Cavity of Mice Show Asbestos-like Pathogenicity in a Pilot Study ». *Nature Nanotechnology* 3, n° 7 (juillet 2008): 423-28. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.111>.
- (Rittié, 2017) Rittié, Laure. « Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections ». In *Fibrosis*, édité par Laure Rittié, 1627:395-407. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26.
- (Rittinghausen et al., 2014) Rittinghausen, Susanne, Anja Hackbarth, Otto Creutzenberg, Heinrich Ernst, Uwe Heinrich, Albrecht Leonhardt, et Dirk Schaudien. « The Carcinogenic Effect of Various Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) after Intraperitoneal Injection in Rats ». *Particle and Fibre Toxicology* 11, n° 1 (décembre 2014): 59. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0059-z>.
- (Ruiz-Cordero et Devine, 2020) Ruiz-Cordero, Roberto, et Walter Patrick Devine. « Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer ». *Surgical Pathology Clinics* 13, n° 1 (mars 2020): 17-33. <https://doi.org/10.1016/j.path.2019.11.002>.
- (Sakamoto et al., 2018) Sakamoto, Yoshimitsu, Motoki Hojo, Yuki Kosugi, Kimiyo Watanabe, Akihiko Hirose, Akiko Inomata, Toshinari Suzuki, et Dai Nakae. « Comparative Study for Carcinogenicity of 7 Different Multi-Wall Carbon Nanotubes with Different Physicochemical Characteristics by a Single Intraperitoneal Injection in Male Fischer 344 Rats ». *The Journal of Toxicological Sciences* 43, n° 10 (2018): 587-600. <https://doi.org/10.2131/jts.43.587>.
- (Saleh et al., 2020) Saleh, Dina Mourad, William T. Alexander, Takamasa Numano, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, Sivagami Gunasekaran, David B. Alexander, Mohamed Abdelgied, et al. « Comparative Carcinogenicity Study of a Thick, Straight-Type and a Thin, Tangled-Type Multi-Walled Carbon Nanotube Administered by Intra-Tracheal Instillation in the Rat ». *Particle and Fibre Toxicology* 17, n° 1 (décembre 2020): 48. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00382-y>.

- (Sargent et al., 2014) Sargent, Linda M, Dale W Porter, Lauren M Staska, Ann F Hubbs, David T Lowry, Lori Battelli, Katelyn J Siegrist, et al. « Promotion of Lung Adenocarcinoma Following Inhalation Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes ». *Particle and Fibre Toxicology* 11, n° 1 (2014): 3. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-3>.
- (Snyder et al., 2019) Snyder, Ryan J, Kirsten C Verhein, Heather L Vellers, Adam B Burkholder, Stavros Garantziotis, et Steven R Kleeberger. « Multi-Walled Carbon Nanotubes Upregulate Mitochondrial Gene Expression and Trigger Mitochondrial Dysfunction in Primary Human Bronchial Epithelial Cells », s. d., 19. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1655107>
- (Sung et al., 2021) Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, et Freddie Bray. « Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, n° 3 (mai 2021): 209-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (Tahara et al., 2012) Tahara, Yoshio, Maki Nakamura, Mei Yang, Minfang Zhang, Sumio Iijima, et Masako Yudasaka. « Lysosomal Membrane Destabilization Induced by High Accumulation of Single-Walled Carbon Nanohorns in Murine Macrophage RAW 264.7 ». *Biomaterials* 33, n° 9 (mars 2012): 2762-69. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.023>.
- (Valavanidis et al., 2013) Valavanidis, Athanasios, Thomais Vlachogianni, Konstantinos Fiotakis, et Spyridon Loridas. « Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, n° 9 (27 août 2013): 3886-3907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>.
- (Veetil et Ye, 2009) Veetil, Jithesh V., et Kaiming Ye. « Tailored Carbon Nanotubes for Tissue Engineering Applications ». *Biotechnology Progress* 25, n° 3 (mai 2009): 709-21. <https://doi.org/10.1002/btpr.165>.
- (WHO, 2015) Travis, W. D. "Cancer IaFRO, Pathology IaO." Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon, France (2004).
- (Wick et al., 2007) Wick, P, P Manser, L Limbach, U Dettlaffweglikowska, F Krumeich, S Roth, W Stark, et A Bruinink. « The Degree and Kind of Agglomeration Affect Carbon Nanotube Cytotoxicity ». *Toxicology Letters* 168, n° 2 (30 janvier 2007): 121-31. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.019>.
- (Xue et al., 2020) Xue, Jiaming, Simone Patergnani, Carlotta Giorgi, Joelle Suarez, Keisuke Goto, Angela Bononi, Mika Tanji, et al. « Asbestos Induces Mesothelial Cell Transformation via HMGB1-Driven Autophagy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, n° 41 (13 octobre 2020): 25543-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007622117>.

Développement d'un modèle de cancer pulmonaire induit par les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbones (CNT) sont des nanomatériaux constitués de feuillets d'atomes de carbone, enroulés sur eux-mêmes pour donner cette forme de tube. Les CNT sont aujourd'hui exploités industriellement car ils confèrent aux matériaux des propriétés électroniques et mécaniques intéressantes. Certains CNT en forme d'aiguille ont cependant été classés comme particules potentiellement cancérigènes pour l'Homme. Des études précédentes ont montré que ces CNT rectilignes induisaient le mésothéliome malin et le cancer pulmonaire chez le rat. Les mécanismes immunologiques liés à ces cancers restent à découvrir. Le but de notre étude est de développer un modèle de cancer pulmonaire chez la souris en utilisant des CNT afin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans le développement de la pathologie cancéreuse.

A partir de souris A/J, nous avons développé un modèle de co-carcinogénicité en utilisant des CNT-7 (rectilignes), des CNT-T (courbés, non mésothéliomagéniques) et du 3-méthylcholanthrène (3MC). Le 3MC est un carcinogène chimique dont l'activité cancéreuse est amplifiée par des particules réactionnelles. Dans un second temps, nous avons exposé des souris B6 aux mêmes particules, ainsi qu'au CB (carbon black, non cancérigène) toujours en présence du 3MC. Le carcinogène 3MC est injecté en faible quantité (250µg) par injection intra-péritonéale tandis que les particules sont injectées par aspiration oro-pharyngée (100 µg).

Le potentiel cancérigène a été mesuré en utilisant l'imagerie pulmonaire (Scanner Leica SCN400, programme Halo). Les résultats montrent que la co-administration de CNT-7 et de 3MC induit le développement d'adénocarcinomes papillaires infiltrants chez les souris A/J, confirmant l'intérêt du modèle. Les CNT-T ont, par ailleurs, des effets génotoxiques pulmonaires plus élevés que les CNT-7 chez les souris A/J et les B6. Les souris B6 exposées au CB ne développent pas d'adénocarcinome papillaire.