



## Université Lille

Ecole doctorale Biologie-Santé de Lille  
Département Biologie, médecine et santé

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

**Discipline : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie  
et nutrition**

Présentée et soutenue publiquement par

**Eva GUILLOTEAU**

Le 9 mars 2022

**ETUDE ET COMPRÉHENSION D'UNE EXPOSITION A LA  
POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE SUR L'HOMÉOSTASIE  
INTESTINALE MURINE**

### Composition du jury :

**Président:** Pr Xavier COUMOUL - Université Paris Descartes, PRES

**Rapporteurs :** Pr Armelle BAEZA - Université de Paris  
Pr Luc FERRARI - Université de Lorraine - Henri Poincaré (Nancy)

**Examineurs :** Dr Fatima SMAGULOVA - IRSET, CRCN Rennes

**Directrice de Thèse :** Dr Mathilde BODY-MALAPEL - Université de Lille - INFINITE



**« L'obstination est le chemin de la réussite »**  
Charlie Chaplin

**« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté.  
Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien :  
il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels  
qui l'impressionnent comme des contes de fées. »**  
Marie Curie





<b>Table des matières</b> .....	<b>5</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>13</b>
<b>Liste des figures et tableaux</b> .....	<b>17</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>19</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>23</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>25</b>
<b>Partie I – Introduction</b> .....	<b>27</b>
<b>I - Le tractus gastro-intestinal</b> .....	<b>29</b>
1- L’anatomie et l’histologie du Tube Digestif .....	29
2- Les fonctions du Tractus Gastro-Intestinal .....	35
3- Le système immunitaire intestinal .....	42
Système Immunitaire Inné .....	44
Système Immunitaire Adaptatif .....	46
Le Tissu Lymphoïde du Tube Digestif .....	50
4- Particularité du Système immunitaire Intestinal .....	53
Le microbiote intestinal.....	53
Contrôle de l’homéostasie intestinale, élément essentiel pour l’équilibre immunitaire.....	63
<b>II - La pollution atmosphérique</b> .....	<b>81</b>
1- Définitions et Généralités.....	81
La pollution extérieure .....	82
La pollution intérieure.....	87
2- Les effets de la pollution de l’air sur la Santé Intestinale.....	97
Effets de la pollution de l’air sur la santé intestinale .....	99
Effets des polluants atmosphériques sur le microbiote intestinal .....	109
Fenêtre de susceptibilité gestationnelle .....	115

<b>III - Les MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin .....</b>	<b>117</b>
<b>1- Définitions et Généralités.....</b>	<b>117</b>
<b>2- L'axe poumon-intestin : un élément clé et essentiel dans la survenue des MICIs ?.....</b>	<b>122</b>
Généralités .....	122
L'élaboration de l'axe poumon-intestin et son maintien .....	124
Le microbiote des voies aériennes .....	126
Dysbiose – MICI et pathologies respiratoires .....	129
Perturbations de l'axe poumon-intestin au cours de la dysbiose .....	130
Modulation immunitaire du tube intestinal et des voies aériennes.....	131
<b>Objectifs.....</b>	<b>135</b>
<b>Partie II – Résultats.....</b>	<b>139</b>
<b>Effet de l'exposition par inhalation d'un cocktail de nanoparticules manufacturées sur l'homéostasie intestinale de la souris .....</b>	<b>141</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>141</b>
<b>Matériel et Méthode .....</b>	<b>142</b>
<i>Article : Exposure to atmospheric Ag, TiO<sub>2</sub>, Ti and SiO<sub>2</sub> engineered nanoparticles modulates inflammatory response and gut microbiota in mice .....</i>	<i>145</i>
<b>Effet d'une exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique complexe sur le système intestinal de la descendance chez la souris .....</b>	<b>175</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>175</b>
<b>Matériel et Méthode .....</b>	<b>176</b>
<i>Article : In utero exposure to simulated complex urban air pollution disturbs intestinal suckling-to-weaning transition in mice .....</i>	<i>179</i>
<b>Partie III – Discussion.....</b>	<b>229</b>
<b>Discussion sur les choix méthodologiques .....</b>	<b>238</b>
<b>1- Choix de l'espèce et du modèle d'étude .....</b>	<b>238</b>
<b>2- Choix du mode d'exposition : répétée ou continue par inhalation, corps entier .....</b>	<b>240</b>
<b>3- Choix du type de pollution et des populations cibles .....</b>	<b>246</b>
<b>Les polluants inhalés impactent l'homéostasie intestinale .....</b>	<b>252</b>
<b>1- L'inhalation de polluants altère le système immunitaire intestinal .....</b>	<b>252</b>
<b>2- Une exposition par inhalation à la pollution atmosphérique se traduit par une modulation de l'homéostasie intestinale de manière sexe dépendante .....</b>	<b>262</b>
<b>3- Les effets de l'exposition aux polluants inhalés pourraient être caractérisés grâce à des modèles <i>in vitro</i> .....</b>	<b>264</b>
<b>Effets extrapulmonaires d'une inhalation à la pollution atmosphérique .....</b>	<b>267</b>

<b>Partie IV – Conclusion.....</b>	<b>274</b>
<b>Valorisation de la thèse.....</b>	<b>280</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>295</b>
<b>Partie V – BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>297</b>



Je souhaite remercier sincèrement et avec beaucoup d'émotion les personnes qui m'ont soutenue, de près ou de loin, durant ces trois années de travail stimulant, passionnant, riche et éreintant (j'espère n'oublier personne).

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Docteur Mathilde BODY-MALAPEL, de m'avoir fait confiance, de m'avoir donné et laissé cette belle opportunité d'effectuer une thèse au sein de son équipe. Je remercie le Dr Cécile VIGNAL pour sa présence quotidienne. Merci à Laurent DUBUQUOY pour sa disponibilité et gentillesse, merci à Virginie CHAMEROY pour sa présence et pour la gestion de l'animation scientifique de l'unité, et merci à Bernadette LEU pour la gestion administrative de toute l'unité, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Merci à l'équipe pédagogique du C9 de m'avoir permis de réaliser ces heures de monitorat en leurs compagnie, un merci spécial à Sandrine DUVET et Isabelle HUVENT de m'avoir offert cette opportunité que j'ai terriblement adorée.

Merci aux animaliers du DHURE et spécialement à Franck STEVENDART pour sa patience, sa disponibilité, son aide, son écoute et sa bienveillance tout au long de mes nombreux séjours à l'animalerie.

Merci aux membres de mon CSI d'avoir été toujours présents, disponibles, riches de conseils et d'aide, peu importe la situation. Je tiens spécifiquement à remercier le Professeur Xavier COUMOUL et le Professeur Armelle BAEZA pour leurs accompagnements, leurs bienveillances et leurs suivis depuis mes premières années de Master. Merci à vous de me donner cette hargne et rage de toujours continuer et de ne jamais rien lâcher, de m'apporter tous les éléments confortant ma foi en la recherche scientifique. Je tiens à adresser à Xavier COUMOUL toute ma reconnaissance pour son implication et son suivi depuis mon arrivée à l'Université Paris Descartes, merci de m'avoir toujours accompagnée, aidée, soutenue dans mes choix et dans mes aspirations professionnelles. Ce fut un véritable plaisir et honneur de vous côtoyer pendant ces dernières années.

Merci à Christophe et Madjid, à vous deux, de m'avoir accueillie avec gentillesse, bienveillance et sympathie, de m'avoir laissé manger la moitié « des gourmandises » qu'on retrouvait dans le bureau, d'avoir été patients et calmes devant mes innombrables et répétitives questions, d'avoir été disponibles et disposés pour m'aider... Bref un grand merci à vous deux les garçons !

A vous, Matthias, Clovis, Rogatien, Karine et Faustine merci pour tous ces bons moments passés ensemble, merci sincèrement pour l'accueil chaleureux que vous m'avez fait à mon arrivée dans le grand Nord ! Je sais que l'on va vous manquer, moi et mes fringales quotidiennes ! Merci à François et Momo pour ces moments de détente au détour d'un couloir, ces taquineries incessantes mais, qui restent, au final tellement attachantes...

Merci à tous les autres membres de l'équipe INFINITE, Ségolène, Rodolphe, Fatima, Marie, Arnaud, Sylvia, Manel, Solange, Vincent, Aurélien, Nathan, Guillaume, Léa... avec qui j'ai pu partager un café, des éclats de rire, des moments plus sombres et tristes en manips, des déjeuners... Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance, ce fut un vrai plaisir de vous côtoyer pendant ces (presque) quatre années !

Encore merci à tous ceux qui ont participé à l'élaboration de cette thèse, tant au niveau professionnel que personnel, de manière pérenne ou furtive. A ceux qui ont été présents pendant cette période complexe qu'était le confinement de mars 2020 ou de novembre 2020. Cette expérience de vie implique une telle énergie, un tel investissement qui fait que tout ce que l'on vit en dehors y contribue, alors merci de loin ou de prêt à ceux qui m'ont permis de conforter mes décisions, mes choix de vie. On apprend tant par la réussite que par l'échec ou la déception. Chaque étape à son expérience et chacune d'elles m'ont permis d'arriver ici, et face à cet avenir, aujourd'hui concret, défini et certain qui m'attend.

Merci à mes ami(e)s Antoine, Joaquim, François, Béatrice, Enzo, Max, Thibaut, et j'en passe, d'avoir partagé mes moments de joie (et parfois de peur et détresse intense) sur ces dernières années. On dit qu'on est riche de ses ami(e)s, bah moi j'ai un sacré portefeuille les gars ! Et puis c'est top car avec vous, on sort et on oublie tout, ça flash partout !!

Merci Béa, pour nos discussions profondes, nos moments de rire et surtout merci beaucoup pour toute cette bienveillance et amitié ! Que la force soit avec toi, va, vies et deviens petite Béa.

Un merci tout particulier à Clélie, qui est et a toujours été présente à mes côtés depuis nos plus jeunes années et peu importe la conjoncture : bravo à toi et merci pour ton soutien, ta présence, ta bienveillance, ta gentillesse, ton amitié si précieuse et sans failles, tes conseils appropriés toujours très avisés. Elles sont loin nos sessions de travail acharné à la BU où l'insouciance des surnoms nous faisait tenir tard sur nos cours de PACES... Cela ne nous rajeunit pas tout ça !

Merci à Marine, Marinou, qui malgré toute la folie que l'on partage, sait garder le cap et remettre les choses en perspectives quand il le faut. Merci pour ton amitié, nos appels et débats infinis, nos moments à nous, nos projets d'avenirs communs, pour ta confiance et ton soutien indéfectible. Prépare bien Jojo et Antoine, ça va envoyer du lourd sur Rennes. Les amies c'est comme le bon vin, on les aime et les apprécie encore plus avec le temps : cuvée spéciale ! T'es la meilleure baby !

Julie, toi que j'ai réellement connu à Montréal, toi qui ne m'as jamais laissée depuis et avec qui j'ai beaucoup partagé, merci, merci à toi de m'avoir soutenue, suivie, accompagnée durant ces dernières années et d'être toujours et encore présente. T'es bien fine mon petit chat !

Norhane, à toi, ma comparse de galère, mon amie de pause-café, mon amie au-delà de ces trois ans : force et honneur. On aura commencé ensemble et fini ensemble, après bien de difficiles périodes. Merci d'être toujours là et d'avoir toujours été présente en ces périodes plus ou moins sombres. On a réussi baby girl ! La vie va vraiment pouvoir enfin commencer, tiens-toi prête, tu n'as encore rien vu ! A Constance, merci d'avoir été là avant le début de ces trois années et d'avoir toujours été présente ensuite. Merci à toi et à ton Thibaud, pour nos moments simples mais tellement agréables passés à discuter de tout et rien sur un fond de musique endiablée... Merci d'avoir toujours été là, en visio ou pas. Merci à tous les deux pour votre amitié, riche de valeurs et de sincérité. Jamais je ne l'oublierai ! Et soyez moins beaux et parfaits, s'il vous plait, c'est fatigant de subir votre bonheur...

A celle qui partage mon amour pour le Sud-Ouest et qui est plus grande que moi (ce qui se fait de plus en plus rare), merci. Merci ma Ludi, d'avoir toujours répondu présente et de m'avoir soutenue et apportée autant. Merci à toi, à ton grand cœur et à ton accent sublimant la moindre de tes intonations, d'être entrée dans ma vie, on ne se lâche plus ma grande !

Merci à ces trois comparses de vie de thésarde, merci de m'avoir offert votre amitié, de m'avoir apporté amour, gentillesse, soutien et bienveillance incessante. Il y a toujours du positif dans chaque événement de vie, vous faites parties de ces belles rencontres que l'on a peu, merci.

Karliem, ma bichette, merci à toi de m'avoir fait confiance et de continuer à me faire part de ton amitié. Tu es arrivée tard, mais on rattrapera le temps perdu, ne t'inquiètes pas. Vive la Belgique libre !

Mimie, toi, c'est la famille, tu sais déjà tout, mais merci. Merci d'avoir autant aimé le Nord, de m'avoir fait confiance et d'avoir toujours répondu présente même quand c'était limite.

On en aura des belles à raconter plus tard, je commencerai par le tout début comme j'ai l'habitude et tu continueras par cette année sur Lille ensemble ! Merci à ta golfinelle, à nos pass, et à notre folie insouciantes !

Carla, ma sœur, cette dénomination qui signifie tellement, mon sang, ma colocataire, la meilleure de toute, ma meilleure amie, ma moitié, merci d'avoir chamboulé ma vie il y a de ça plus de 25ans... Merci d'avoir été toi, patiente, forte d'amour, de bienveillance, de soutien, de franchise, de compréhension, de folie, ... Merci de m'avoir soutenue et supportée pendant ces années, ces très belles années de vie commune. Cette thèse je te la dois autant qu'à deux autres personnes. La vie est tellement plus belle à tes côtés.

Enfin, merci à mes parents, Alain et Virginie, qui m'ont tant appris, tant donné au niveau scientifique par leur éducation riche, curieuse, profonde, diversifiée, mais aussi au niveau humain, par leurs valeurs, leur amour, leur bienveillance, leurs conseils, leur soutien et accompagnement sans limite d'espace ou de temps. Papa, Maman, je vous dois ce que je suis, merci à vous deux, je vous aime.



ADN : Acide désoxyribonucléique	Ag : argent	Fcgrt : Fc Fragment Of IgG Receptor And Transporter
AhR : Récepteur d'aryl hydrocarbure		FK : Fibrose Kystique
AIEC : Adherent-Invasive <i>E.Coli</i>		Foxp3 : Forkhead Box P3
AIM2 : Absent In Melanoma 2		GALT : Gut Associated Lymphoïd Tissu
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens		Gata3 : GATA Binding Protein 3
AGCC : Acides gras à chaîne courte		Gd : Gestational day
AMPc : Adenosine 3',5' monophosphate cyclique		GLP-1 : Glucagon-like peptide 1
ARN : Acide Ribonucléique		GPCR : Récepteur couplé aux protéines G
Ass1 : Argininosuccinate Synthase 1		GPX : Glutathion peroxydase
BAL : Lavage bronchoalvéolaire		GSK3beta : Glycogene synthase kinase 3beta
BALT : Tissu lymphoïde associé aux bronches		HAPC : Contractions propagées de hautes amplitudes
BCPO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive		HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
Cat : Catalase		HDAC : Histones Désacétylases
CD : Cellules dendritiques		HDM : House Dust Mite
CCK : Cholécystokinine		HPA : Hypothalamo-hypophyse-surrénale
CEE : cellules entéroendocrines		Hsp : Heat shock protein
CEI : cellules épithéliales intestinales		IBD : Inflammatory Bowel Disease
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer		IC : Indice de confiance
CO : Monoxyde de carbone		IEL : lymphocytes intraépithéliaux
COV : Composés organiques volatils		IFN $\gamma$ : Interferon gamma
CREB : Protéine se fixant au CRE		IFR : Interfollicular Regions
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes		IgA : Immunoglobuline A
CXCL10 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 10		IL1 $\beta$ : Interleukine 1 beta
DEP : Diesel exhaust particulate		IL6 : Interleukine 6
DSS : Dextran Sodium Sulfate		IL10 : Interleukine 10
E.coli : Escherichia coli		IL12 : Interleukine 12
EN : Engineered nanoparticles		IL13 : Interleukine 13
ENM : mixture of engineered nanoparticles		IL17 : Interleukine 17
FAE : Follicle Associated Epithelium		IL17a : Interleukine 17a
		IL17f : Interleukine 17f

IL18 : Interleukine 18	NOS : Monoxyde d'azote
IL21 : Interleukine 21	NP : Nanoparticules
IL22 : Interleukine 22	NQO1 : NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
IL23 : Interleukine 23	Nrf2 : Facteur nucléaire 2 lié à l'érythroïde-2
ILC : Cellules lymphoïdes innées	O <sub>3</sub> : Ozone
ILF : Follicules lymphoïdes isolés	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
iNKT : invariant natural killer T cells	OR : Odds ratio
JAM : Molécules d'adhésion jonctionnelles	PAMP : Peptides antimicrobiens (AMP)
Lct : Lactase	PCNA : Proliferating cell nuclear antigen
Lgr5 : Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5	PCB : Polychlorés biphényles
LP : Lamina propria	PGN : peptidoglycane
LPS : Lipopolysaccharide	PGRP : Mammalian Peptidoglycan Recognition Proteins
LRR : Répétitions riches en leucine	PI3K : Phosphoinositide-3-kinase
MALT : Mucosal Associated Lymphoid Tissue	PlgR : Récepteur polymérique des immunoglobulines
MAP : Protéines Kkinases activées par les mitogènes	PM : Particulate Matter
MC : Maladie de Crohn	PP : Plaques de Peyer
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1	PSA : Polysaccharide A
MDA : Malondialdéhyde	PRR : Pattern recognition receptor
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	RCH : Rectocolite hémorragique
MLN : Ganglion lymphatique mésentérique	RNS : Espèces réactives azotées
MMC : Complexe moteur migrant	ROR $\gamma$ t : Retinoid acid-related orphan receptor $\gamma$ t
MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique	ROS : Reactive oxygene species
Muc2 : Mucin 2	RT-qPCR : Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction
NKT : Cellules tueuses naturelles	SCFA : Short chain fatty acid
NLR : NOD-like receptor	SD : Système digestif
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3	SII : Syndrome de l'intestin irritable
NO : Oxyde nitrique	SiO <sub>2</sub> : Dioxyde de silicium
NO <sub>2</sub> : Dioxyde d'azote	SNC : Système Nerveux Central
NOD : Nucléotide binding oligomerization domain	SNE : Système Nerveux Entérique
	SNP : Single nucleotide polymorphism
	SOD : Superoxide Dismutase

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

Tbet : TBX21 T-Box Transcription Factor 21

Tfh : Cellules T folliculaires auxiliaires

TGF $\beta$  : Transforming growth factor beta

TGI : Tractus Gastro Intestinal

Th1 : T helper 1

Th2 : T helper 2

Th17 : T helper 17

Treg : Cellules T régulatrices

TLR : Toll-like Receptor

Ti : Titane

TiO<sub>2</sub> : Dioxyde de titane

TNF $\alpha$  : Tumour necrosis factor alpha-like

TSLP : Lymphopoïétine stromale thymique

UFP : Particules ultra fines

VEGF : Facteur vasculaire de croissance endothéliale

ZO : Zonula Occludens



## Liste des figures

<b><u>Figure 1</u> : Anatomie du tube digestif humain : intestin grêle et colon</b>	29
<b><u>Figure 2</u> : Structure histologique du tube digestif : différence histologique entre l'intestin grêle (small intestine) et le colon (large intestine)</b>	30
<b><u>Figure 3</u> : Composition et structure histologique de la paroi intestinale</b>	32
<b><u>Figure 4</u> : Les différents types de cellules épithéliales dans une villosité et une crypte intestinale</b>	34
<b><u>Figure 5</u> : Anatomie de la muqueuse intestinale et son appareil immunitaire</b>	43
<b><u>Figure 6</u> : L'appareil immunitaire varie tout au long du tractus intestinal</b>	49
<b><u>Figure 7</u> : Les niches métaboliques du microbiote intestinal</b>	56
<b><u>Figure 8</u> : Signature microbienne dans un contexte sain ou inflammé</b>	62
<b><u>Figure 9</u> : Présentation des différentes particules de l'air (PM : Particulate Matter)</b>	83
<b><u>Figure 10</u> : Les possibles mécanismes en lien avec la pollution de l'air et impactant le microbiote intestinal</b>	85
<b><u>Figure 11</u> : Les principales sources de pollution de l'air intérieur</b>	87
<b><u>Figure 12</u> : Classification des nanomatériaux basée sur leur composition et leur dimension</b>	89
<b><u>Figure 13</u> : Potentielles voies d'exposition de chaque constituant des nanomatériaux</b>	93
<b><u>Figure 14</u> : Les MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin</b>	118

**Figure 15 : Possible régulation des altérations intestinales via l'axe poumon-intestin**

123

**Figure 16 : Anatomie et composition du microbiote bactérien entre les régions supérieures du tractus respiratoires et celui du tractus digestif**

127

**Figure 17 : Représentation de l'environnement, du microbiote, de la structure anatomique et des facteurs immunologiques contrôlant la composition du microbiote pulmonaire chez un individu sain**

127

Le système intestinal est un système important pour le bon fonctionnement de notre organisme. Il est responsable de la digestion des aliments permettant à l'organisme d'assimiler l'ensemble des éléments nécessaires à son bon fonctionnement. Il permet d'effectuer le trajet des aliments entre leur arrivée par la bouche et leur sortie via les fèces, le long de son tractus. Il est donc confronté aux éléments extérieurs et étrangers principalement par la voie buccale/orale, qui permet l'arrivée des aliments, ou le passage de l'air via la respiration secondaire.

L'intestin est considéré comme le deuxième cerveau de l'organisme de par sa composition et sa spécificité. Il possède un microbiote lui permettant de réguler son fonctionnement et son système immunitaire. Lors d'une inflammation intestinale, le microbiote voit sa composition modulée rompant l'homéostasie intestinale physiologique ; une dysbiose apparaît. Cette dysbiose peut être à l'origine de la survenue de maladies intestinales comme **les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les MICI**, qui ont une prévalence de plus en plus forte dans la population mondiale. Ces MICI comprennent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RH) (10, 11). Elles se caractérisent par l'inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif, qui est due à une dérégulation du système immunitaire (12). A ce jour, il n'existe pas de traitement pour guérir ces maladies, même si les thérapeutiques actuelles permettent d'améliorer la qualité de vie des patients atteints. En 2015, la France comptait 212 700 personnes prises en charge pour une MICI (60% de MC et 40% de RH) (Inserm – Dossier Maladies Inflammatoires chroniques de l'Intestin - MICI 2017). De plus, ces maladies sont plus fréquemment diagnostiquées chez le jeune adulte de 20 à 30 ans. Par ailleurs, de plus en plus de cas de MICI infantiles apparaissent et l'on s'interroge sur le rôle potentiel de certains facteurs lors de la vie *in utero*.

Les facteurs de risque de développement de MICI sont divers, mais il semblerait que seulement 20% soient d'origine génétique, le reste résultant d'une exposition à d'autres facteurs comme le stress, le tabac, l'appendicite, l'alimentation, la pollution de l'air, etc (13-15).

En outre, il existe des preuves épidémiologiques associant un épisode de pollution atmosphérique à un pic d'hospitalisation pour des MICI (16, 17). Une corrélation positive a été effectuée entre l'augmentation du nombre d'admission aux urgences pour des pathologies intestinales et un pic de pollution atmosphérique concomitant par une équipe américaine. La pollution de l'air pourrait donc avoir un lien causal dans le développement des MICI.

**La pollution atmosphérique** est un problème de santé publique. Le grand smog de Londres en 1950 a été un événement majeur qui a fait prendre conscience de l'impact de la qualité de l'air sur la santé. Ce brouillard dense recouvrit Londres du vendredi 5 au mardi 9 décembre 1952, et a été considéré comme la pire pollution atmosphérique de toute l'histoire du Royaume-Uni. Dans les semaines qui suivirent, les statistiques élaborées par les services médicaux firent apparaître que le brouillard avait engendré l'apparition de 100 000 malades, et tué **12 000 personnes**. La plupart des victimes étaient très jeunes, âgées, ou avaient des problèmes respiratoires préexistants. Environ 8 000 décès d'origine cardiaque ou respiratoire se produisirent dans les mois suivants et furent attribués au smog (18). De nombreux travaux épidémiologiques ont depuis démontré que les effets sanitaires de la pollution atmosphérique ne sont pas limités à des situations de pics de pollution mais sont principalement dus à une exposition à une pollution chronique (19).

En 2013, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), a conclu que la pollution de l'air extérieur est cancérigène pour l'homme (Groupe 1 – Programme de Monographie du CIRC octobre 2013). Elle augmente le risque de cancer du poumon et est aussi responsable d'un risque accru de survenue du cancer de la vessie. Les particules en suspension (ou matières particulaires), une composante majeure de la pollution de l'air, mais également d'autres contaminants présents dans l'atmosphère, comme le benzène, le formaldéhyde ou certains Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont aussi classés comme cancérogènes pour l'Homme (Groupe 1) par le CIRC.

La pollution de l'air est complexe. Elle résulte d'un mélange de gaz toxiques (ozone, dioxyde de soufre, oxydes d'azote, composés organiques volatils...) et de particules de différentes tailles et de composition variable. Si certains de ces contaminants peuvent être d'origine naturelle, leur accroissement dans l'air est principalement lié aux activités anthropiques. Le cocktail de contaminants et leurs concentrations varient beaucoup selon les lieux, les saisons en fonction des sources d'émission et des conditions météorologiques.



La réglementation toujours plus sévère vise à réduire les concentrations dans l'air d'un certain nombre de ces contaminants. Néanmoins, les progrès technologiques sont sources de nouveaux contaminants potentiels. Ainsi avec l'avènement des nanotechnologies, de nouveaux matériaux manufacturés de taille nanométrique sont produits et peuvent se retrouver dans l'atmosphère. Ces nanomatériaux sont présents dans de nombreux objets de notre quotidien représentant de multiples sources d'exposition en milieu intérieur. Leur utilisation récente fait que l'on ne dispose pas à ce jour de données épidémiologiques permettant de conclure à un risque pour la santé. Néanmoins de nombreux travaux toxicologiques sont menés pour déterminer leurs dangers potentiels.

La principale cible des polluants atmosphériques est l'appareil respiratoire où ils contribuent au développement de cancers (classement CIRC : cancérogène avéré pour l'Homme) mais aussi à la survenue et/ou exacerbation de pathologies inflammatoires chroniques comme l'asthme et les broncho-pneumopathies chroniques obstructives notamment auprès des populations sensibles (20). Leur impact sur les pathologies cardiovasculaires est également maintenant bien documenté. Des travaux plus récents montrent qu'ils pourraient aussi avoir des effets sur des pathologies neurodégénératives, sur les maladies métaboliques et sur le développement, notamment dans le cas d'une exposition *in utero*. En ce qui concerne l'intestin et les MICI, quelques études épidémiologiques ont montré une association entre un épisode de pollution atmosphérique et un pic d'hospitalisation pour des MICI (16, 17).

Dans ce contexte, il apparaît pertinent d'évaluer dans quelle mesure la pollution atmosphérique peut avoir un impact sur le développement des MICI et sur la modulation de l'homéostasie intestinale. Ceci s'inscrit dans la connaissance de l'existence d'un axe poumon-intestin où le microbiote intestinal influence l'immunité pulmonaire et vice-versa. Ce dialogue entre organes pourrait potentiellement expliquer la survenue d'effets néfastes observés dans la sphère intestinale suite à une exposition par inhalation. En effet, des travaux ont démontré qu'une exposition par inhalation aux PM chez la souris adulte entraînait une modulation du système immunitaire intestinal (21).

**Cette thèse de toxicologie va avoir pour objectif d’explorer grâce à des modèles animaux, les effets de l’inhalation de polluants de l’air sur l’homéostasie intestinale et le développement des MICI.** Deux types d’atmosphère vont être étudiés : une atmosphère urbaine très polluée comprenant un mélange de gaz et de particules, et un aérosol constitué d’un mélange de nanoparticules manufacturées. Par ailleurs, deux scénarios d’exposition vont être considérés : l’exposition d’animaux adultes sains ou présentant une MICI induite et l’exposition *in utero*.

Ce mémoire de thèse est organisé de la façon suivante : un bilan de la bibliographie scientifique actuellement disponible sera effectué dans un premier lieu. Cette synthèse permettra d’établir les caractéristiques du système intestinal, de la pollution de l’air et enfin des MICI. Les objectifs détaillés de cette thèse seront ensuite énoncés et seront suivis de la présentation des résultats. Ceux-ci vont être présentés sous la forme de deux articles rédigés en anglais mais précédés d’une introduction en français pour rappeler les questions posées dans chacun d’entre eux et les moyens mis en œuvre pour y répondre. Ce manuscrit se terminera par une discussion générale et globale des résultats obtenus lors de cette thèse et ouvrira sur des perspectives.

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d’un financement obtenu suite à une présentation au concours de l’école doctorale de l’ED BSL de Lille, sous la direction du Docteur Mathilde BODY-MALAPEL.

## RESUME/ABSTRACT

Notre société du 20ème siècle a connu la mondialisation, l'urbanisation, une modernisation et une industrialisation. Elle a évolué et a changé en devenant de plus en plus moderne, industrielle, innovante, forte de créations chimiques, biologiques et mécaniques. La société du 21ème siècle est source d'innovations techniques et technologiques révolutionnant le monde et modifiant l'environnement. Par exemple, les émanations des industries, du trafic routier, de la dispersion dans l'air d'éléments manufacturés, sont des facteurs importants de la pollution de l'air. Ces éléments ont un impact sur l'environnement et sur la Santé Humaine, et deviennent un problème de Santé Publique.

Depuis quelques années, il est observé une augmentation des cas d'hospitalisations suite à des épisodes de pollution atmosphérique. Une augmentation de la prévalence des maladies respiratoires, cardiovasculaires, métaboliques, neuronales est apparue à travers le globe. Une augmentation du nombre de cas de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin en lien avec des épisodes de pollution atmosphérique est observée. Ces maladies sont la Maladie de Crohn et la Rectocolique Hémorragique, des maladies autoimmunes présentant une inflammation d'une partie du tube digestif, due à une dérégulation du système immunitaire intestinal. Leurs causes sont multifactorielles, 20% sont d'origine génétique et le reste aurait une origine environnementale.

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'essayer de comprendre les effets d'une exposition à la pollution de l'air sur leur développement, autrement dit, d'étudier leurs effets sur la pathogenèse des MICI.

Nos travaux ont été effectués sur des modèles murins exposés via une inhalation corps entier, à différents types de pollution, pour reproduire le plus fidèlement possible une exposition humaine.

Une première étude a été effectuée et a permis d'étudier les effets de la pollution intérieure. Cette pollution est modélisée par un cocktail de nanoparticules, les plus fréquemment retrouvées dans l'environnement quotidien des individus. Cette étude sur des souris saines ou présentant une colite induite chimique, de 28 jours (exposition subchronique) a été effectuée, avec une dose représentative de la limite d'exposition professionnelle au TiO<sub>2</sub>.

Une seconde étude a permis d'analyser et d'étudier les effets d'une exposition gestationnelle par inhalation à une pollution atmosphérique complexe, type Pékin, sur le développement, la maturation du système intestinal de la descendance. Il y a de plus en plus de preuves de l'existence d'une fenêtre de susceptibilité gestationnelle. Une exposition *in utero* semble induire et prédisposer au développement de maladies retrouvées dans la population adulte.

Dans ces deux études, l'inflammation au niveau génétique, protéique et histologique a été analysée, sur des populations mâles et femelles. La composition du microbiote intestinal a été analysée afin d'observer si une dysbiose intestinale était induite.

Une exposition gestationnelle induit une microinflammation chez le mâle et la femelle, la perméabilité iliaque est augmentée chez le mâle, le développement, la maturation intestinale et la composition microbienne est modifiée.

L'exposition à notre cocktail de NP induit également une microinflammation chez le mâle, aggrave la colite initialement présente chez la femelle, modifie le microbiote fécal. Enfin, nos EN présentent chacune des effets, lors de test *in vitro*, individualisés.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse démontrent l'importance d'étudier des effets de la pollution atmosphérique sur l'homéostasie intestinale. La structure du système intestinal, sa composition microbienne et sa fonctionnalité semblent en effet être impactées suite à une exposition par inhalation à deux types de pollution atmosphérique. L'axe poumon – intestin semble être un véritable atout pour comprendre et étudier les mécanismes respectivement à l'origine du développement des MICI ou des maladies respiratoires.

At 20th century, the beginnings of globalization, urbanization, modernization and significant industrialization have been done. Society has evolved and changed, becoming a modern, industrial, innovative society in chemical, biological and mechanical creations. The society of the 21st century is a source of technical, technological innovations, revolutionizing the world. Human has used of these new techniques and technologies inducing environmental alterations. Air pollution is one of these, and present various origins from industries, road traffic. Air pollution contains different pollutant, as PM, gaseous constituents, manufactured nanoparticles. These pollutants released in the atmosphere have an impact on the environment and on Human Health, which has become a Public Health problem.

In recent years, there has been an increase of hospitalization following episodes of air pollution. An increase of the prevalence of respiratory, cardiovascular, metabolic and neuronal diseases is observed across the globe. In addition, an increase of cases of Inflammatory Bowel Disease related to episodes of air pollution is observed. These diseases include Crohn's disease and Ulcerative Colitis, which are autoimmune. Patients present inflammation of part of the digestive tract, due to deregulation of the intestinal immune system. Their causes are multifactorial. It seems that 20% is of genetic origin and the rest would have an environmental origin.

In this scientific context, studying and understanding the effects of exposure to air pollution on the development and pathogenesis of IBD seems to be very interesting and constitutes the main objective of my thesis.

Our work was carried out on murine models exposed by whole body inhalation to different types of pollution. We have chosen this exposure to reproduce human exposure as faithfully as possible.

A first study was carried out and studied the effects of indoor pollution. A cocktail of nanoparticles models this pollution. This cocktail contains the most frequent manufactured NP found in the environment and in the daily life of individuals. Healthy mice or mice present a colitis induced chemically were exposed during 28 days (subchronic exposure), with a dose representative of the occupational exposure limit to TiO<sub>2</sub>.

A second study analysed and studied the effects of gestational exposure. Pregnant female were exposed by inhalation to a complex air pollution: Beijing pollution. The study of the effects of this exposure on the development and maturation of the offspring's intestinal system was performed. There is more and more evidence of the existence of a gestational susceptibility window. *In utero* exposure would seem to induce and predispose to the development of diseases found in the adult population.

In both studies, an analysis of intestinal inflammation in male and female populations was performed at genetic, protein and histological level. The composition of the gut microbiota was analysed in order to observe if a dysbiose was induced.

Gestational exposure induces microinflammation in young males and females, iliac patency is increased in males, intestinal development, maturation, and microbial composition is altered too.

Exposure to our cocktail of NP also induces microinflammation in males, aggravates colitis initially present in females, and modifies the faecal microbiota. Finally, our manufactured nanoparticles tested individually, presents in vitro immune effects.

Our work demonstrates the importance of studies showed effects of air pollution on intestinal homeostasis. Indeed, the structure of the intestinal system, its microbial composition and its functionality seem to be impacted by an inhalation to two different types of air pollution. The lung-intestine axis seems to be a real asset for understanding, studying the mechanisms, which are implicated in the development of IBD or respiratory diseases.

# PARTIE I - INTRODUCTION





## STINAL

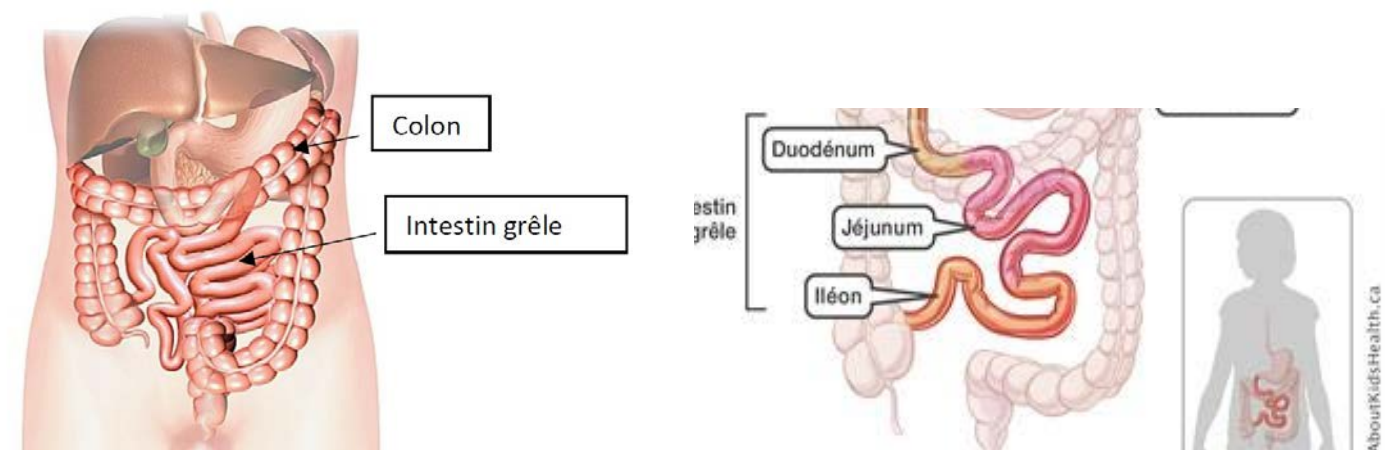
### 1 – L’anatomie et l’histologie du Tube Digestif

#### - Anatomie

Le système digestif (SD) humain permet le transport du bol alimentaire et sa digestion enzymatique, l'absorption d'eau, d'électrolytes et de nutriments nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme mais également la protection contre l'environnement extérieur (par sa fonction de barrière). C'est une structure tubulaire continue composée d'une succession de plusieurs organes et qui peut être divisée en deux parties : le tractus gastro-intestinal supérieur et le tractus gastro-intestinal inférieur.

Les principales fonctions du tractus gastro-intestinal (TGI) sont la motilité, la sécrétion et l'absorption ainsi que l'établissement d'une barrière de protection.

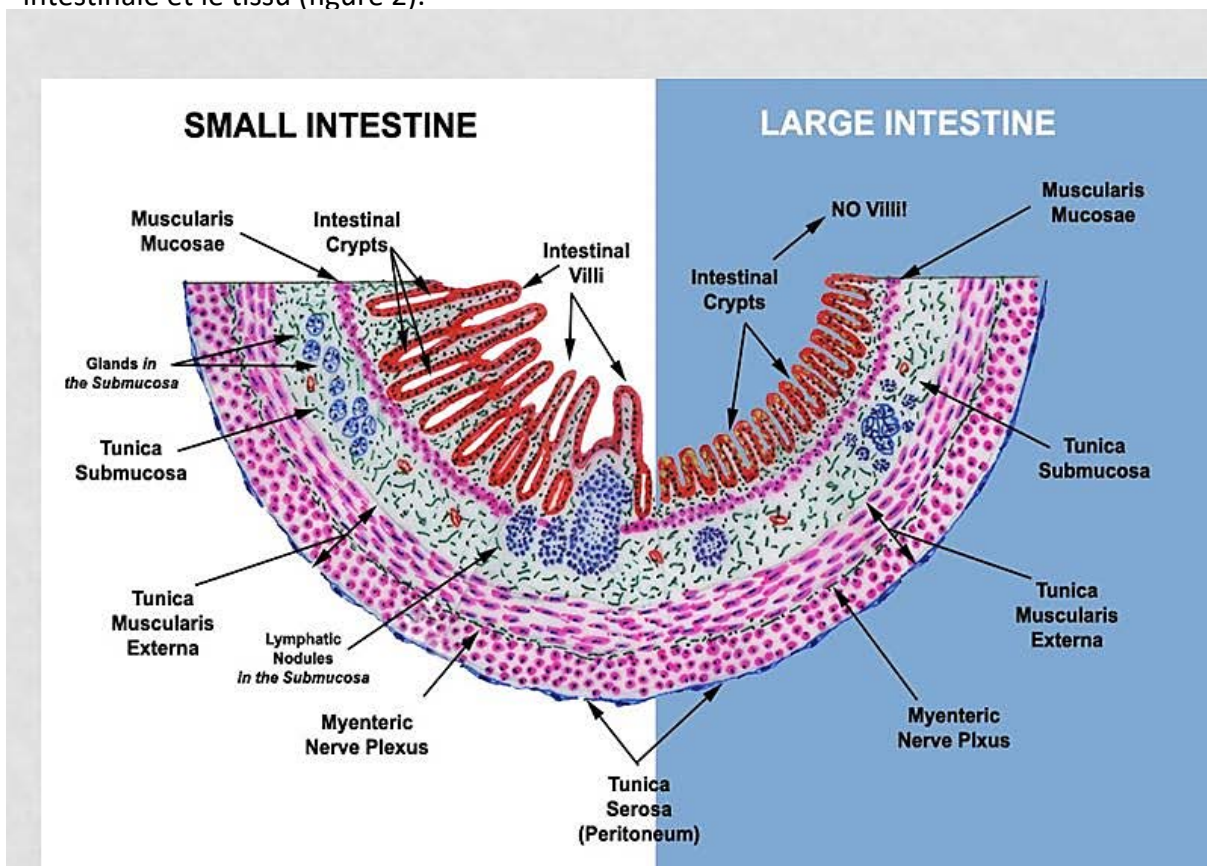
La partie supérieure du TGI comprend la bouche, l'œsophage, l'estomac, et l'intestin grêle alors que la partie inférieure du TGI est constituée du côlon (pouvant également être appelé gros intestin), du rectum et de l'anus (Figure 1).



**Figure 1 : Anatomie du tube digestif humain : intestin grêle et colon.**

- A) positionnement de tube digestif dans la cavité abdominale
- B) l'intestin grêle est composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, et le gros intestin qui fait suite, est quant à lui composé du colon.

L'intestin grêle débute au niveau du sphincter pylorique de l'estomac et comporte trois parties distinctes : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum débute à la sortie du pylore et correspond à la partie proximale de l'intestin grêle, le jéjunum fait suite au duodénum et correspond, donc, à la partie intermédiaire de l'intestin grêle, et, enfin, nous retrouvons l'iléon, partie distale de l'intestin grêle se terminant au niveau du caecum. L'intestin grêle est délimité par une structure spécifique, la muqueuse qui est à l'interface avec la lumière intestinale. Celle-ci est constituée d'une succession de cryptes et de villosités recouvertes de mucus, offrant ainsi une grande surface d'absorption entre la lumière intestinale et le tissu (figure 2).



**Figure 2 : Structure histologique du tube digestif : différence histologique entre l'intestin grêle (small intestine) et le colon (large intestine)**

L'intestin grêle est constitué de villosité et de cryptes de Liber Kühn, le colon lui ne comprend que des cryptes de Liber Kühn

*Histologie du tube digestif, cours L2-L3 Paris Diderot*

En premier, nous retrouvons le caecum qui est une poche sur laquelle vient se terminer l'iléon, son extrémité inférieure se prolonge par l'appendice vermiforme et son extrémité supérieure par le côlon. Puis, le côlon se divise en 4 segments distincts : le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde, ce dernier aboutissant au rectum.

Tout comme l'intestin grêle, cette structure anatomique présente une muqueuse composée, ici, uniquement de cryptes de Lieberkühn qui entrecoupent l'épithélium colique recouvert de mucus.

Après avoir été déposés dans la bouche et avalés, les aliments ingérés sont apportés par l'œsophage vers l'estomac, grâce à une vague de mouvements coordonnés de type péristaltique. Une fois dans l'estomac, le bol alimentaire est transformé par un mélange spécifique constitué à la fois d'enzymes digestives et d'acide gastrique conduisant à l'élaboration du chyme qui accède ensuite au duodénum en traversant le sphincter pylorique. Le processus de digestion s'effectue dans l'intestin grêle. Les protéines, les graisses et les glucides sont dégradés en éléments de plus petites tailles, permettant ainsi l'absorption des nutriments comme les acides gras, les acides aminés, le glucose, les vitamines, l'eau par les structures appropriées. Cette absorption a principalement lieu dans le jéjunum et se termine dans l'iléon.

Lorsque le contenu luminal atteint le côlon, la majorité des nutriments et 90 % de l'eau ont été absorbés. L'excès d'eau restant est alors absorbé, et la dégradation des composés alimentaires restants est réalisée par les bactéries intestinales. A l'issue de ce processus, les fecès se forment. Ils représentent les éléments non retenus par le système digestif et considérés comme détruits par l'organisme et sont préparés pour un stockage avant une expulsion par le rectum et le canal anal.

L'ensemble des processus digestifs nécessaires à la bonne digestion est effectué simultanément et de manière coordonnée. L'anatomie fonctionnelle caractéristique du tractus digestif lui permet d'effectuer ce processus. Les glandes salivaires, le pancréas, le foie, et la vésicule biliaire sont des organes annexes qui concourent à la digestion.

## - Histologie

La paroi intestinale présente une organisation histologique établie en diverses couches cellulaires (figure 3). De la lumière du tube digestif vers l'extérieur on trouve : la muqueuse interne composée de l'épithélium intestinal, la lamina propria et la muqueuse musculaire, la sous-muqueuse contenant les nerfs, les ganglions lymphatiques et le tissu conjonctif, la musculature correspondant à une couche de tissu musculaire lisse longitudinal et circulaire, et enfin, la séreuse ou adventice définie comme la couche externe de type séreuse.

L'épithélium intestinal est composé de divers types cellulaires, et de la lamina propria qui le sépare de la muqueuse musculaire sous-jacente.

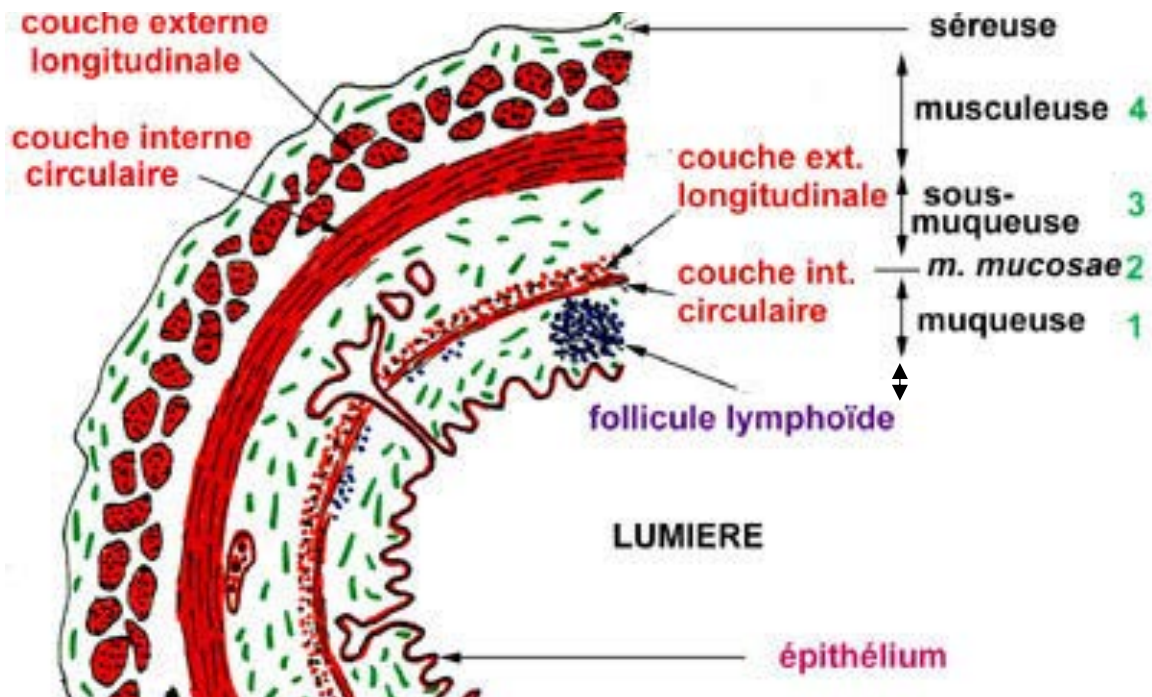


Figure 3 : Composition et structure histologique de la paroi intestinale

La paroi intestinale est composée de la lumière intérieure vers l'extérieur ; de l'épithélium intestinal, de la lamina propria, de la muqueuse musculaire, de la sous-muqueuse, de la musculature et de la séreuse.  
*Histologie du tube digestif, cours L2-L3 Paris Diderot*

L'épithélium intestinal est une monocouche de divers types cellulaires maintenus entre eux, par des jonctions cellulaires assurées par des protéines spécifiques, garantissant son étanchéité paracellulaire. Cette propriété confère à l'épithélium intestinal un rôle de barrière physique.

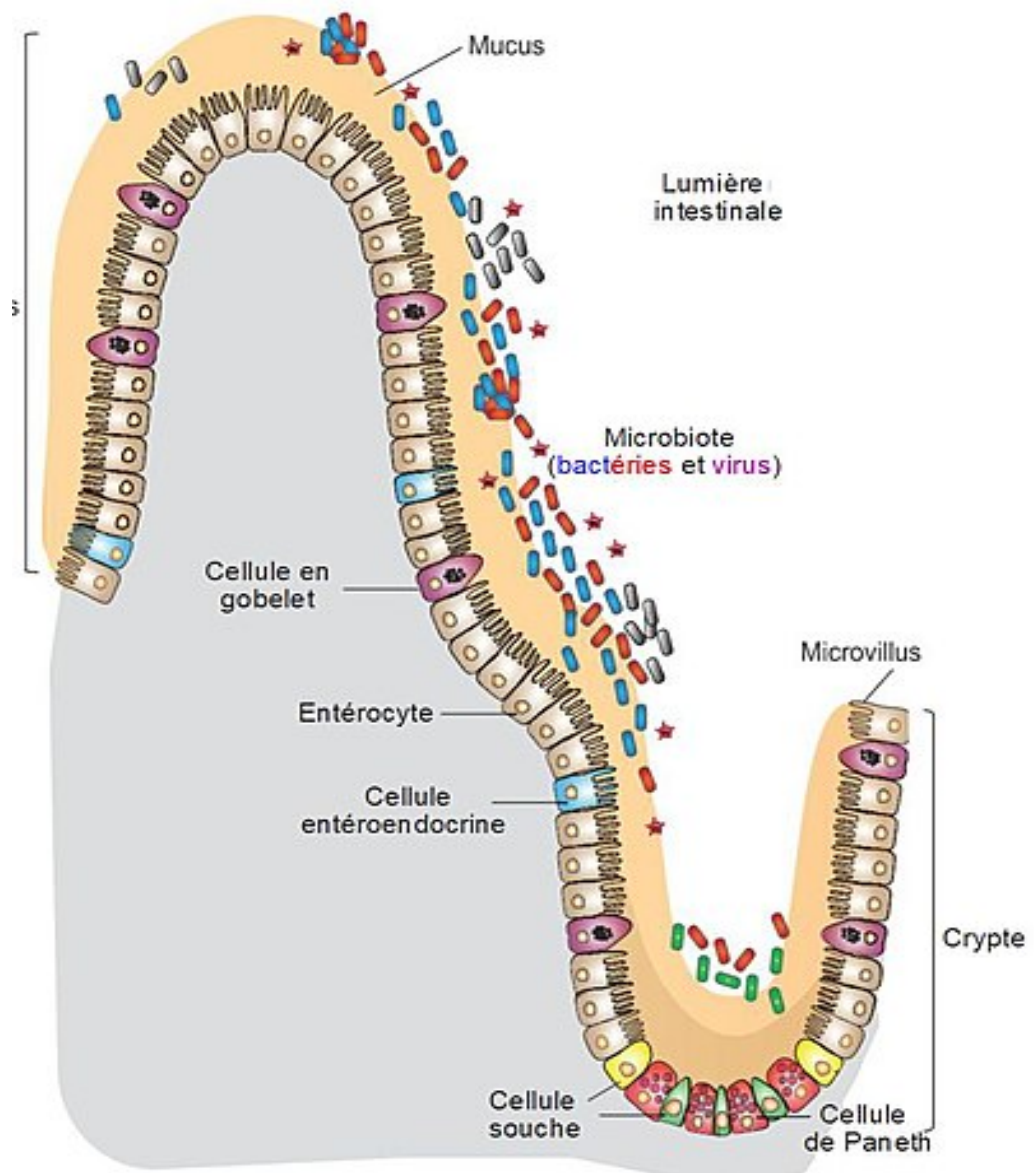
L'épithélium possède différents rôles en fonction de la structure anatomique qu'il tapisse. Dans l'intestin grêle, il protège la paroi de l'acidité du bol alimentaire ainsi que des enzymes digestives et il permet le passage des composés alimentaires.

Dans le côlon, il maintient en suspension les composés antibactériens permettant ainsi de contribuer à la défense antibactérienne.

L'épithélium est constitué de divers types cellulaires comme :

- les entérocytes, qui sont les cellules principales de l'épithélium, elles permettent l'absorption des nutriments, de l'eau et des sels minéraux.
- les cellules caliciformes ou cellules à mucus ou encore appelées cellules en gobelet, qui produisent et sécrètent le mucus. Ce gel alcalin et visqueux tapissant la paroi intestinale est principalement composé de mucines.
- les cellules entérochromaffines, qui sont retrouvées au fond des cryptes intestinales. Ces cellules permettent la bonne motilité intestinale et régulent les différents types de sécrétion.
- les cellules de Paneth, qui se retrouvent également au fond des cryptes de l'intestin grêle et permettent la sécrétion d'enzymes spécifiques, les enzymes à activité antimicrobienne comme le lysozyme, la phospholipase A2.
- les cellules entéroendocrines (CEEs), qui sont dispersées de manière diffuse et aléatoire. Elles participent à l'absorption et la sécrétion d'hormones nécessaire au péristaltisme. Suite à la détection de contenu luminal, elles produisent et libèrent des molécules qui vont soit rejoindre la circulation systémique pour agir comme des hormones sur des cibles distantes, ou agir localement sur des cellules voisines ou sur certains neurones (les neurones entériques et extrinsèques).
- les cellules souches, qui sont également retrouvées au fond des cryptes. Comme leur nom l'indique, elles permettent le renouvellement de tous les types de cellules retrouvées au sein de la muqueuse.





**intestinale.**

L'épithélium intestinal est constitué de différentes populations cellulaires : les cellules en gobelet, les entérocytes, les cellules entéroendocrines, les cellules souches et les cellules de Paneth. L'ensemble de cet épithélium est en contact permanent avec le microbiote intestinal notamment par la présence de microvillosités sur les cellules constitutrices de l'épithélium. La production de mucus par certaines cellules permet la protection de la paroi intestinale.(8)

## 2 – Les fonctions du Tractus Gastro-Intestinal :

### - **La motilité du Tractus Gastro-Intestinal**

Le tonus musculaire lisse et la contractilité sont modulés par les cellules interstitielles de Cajal (CIC), agissant comme un stimulateur cardiaque en générant des ondes lentes électriques se propageant vers le muscle lisse. (22, 23).

La motilité du tractus gastro-intestinal est contrôlée par le système nerveux, l'SNE (Système Nerveux Entérique) et le SNC (Système Nerveux Central), et également par d'autres agents comme certaines hormones et effecteurs paracrines.

Elle se divise en deux fonctionnements distincts : i) le premier apparaît à la suite d'un repas lorsque la lumière intestinale contient le chyme ii) le second, quant à lui, intervient au cours de la période inter-digestive. Lors de la **période digestive**, le péristaltisme et la segmentation apparaissent. Ce sont des mouvements coordonnés contractiles effectués par les muscles lisses longitudinaux et circulaires du TGI. Le péristaltisme consiste en une succession de vagues de contractions derrière le bol alimentaire et de relaxation devant, se déplaçant dans le TGI sur de courtes distances et permettant alors au bol alimentaire de se mouvoir. La segmentation est un mélange de contractions musculaires, plus irrégulières que celles du péristaltisme, et permettant au contenu luminal et aux enzymes digestives d'entrer en contact avec l'épithélium, pour que l'absorption puisse ensuite se produire.

Lors de la **phase inter-digestive**, le complexe moteur migrant (MMC) apparaît. C'est un ensemble d'activité électrique et contractile des muscles du TGI balayant tout l'intestin grêle et le nettoyant de tous les débris alimentaires restants. Dans le gros intestin, il sert à ralentir la descente du contenu luminal, facilitant et permettant ainsi l'absorption d'eau. Dans le côlon, ces mouvements de va et vient permettent le mélange du contenu colique, améliorant ainsi le contact avec la muqueuse absorbante. Enfin, les contractions propagées de hautes amplitudes (HAPC) balayant le côlon, déclenchent souvent l'envie d'expulser le contenu colique, et apparaissent également six à huit fois par jour.

## - La sécrétion et l'absorption du Tractus Gastro-Intestinal

Le tractus gastro-intestinal sécrète jusqu'à neuf litres de liquide par jour, qui présente des enzymes digestives, de la bile, des ions, de l'eau et du mucus. Les cellules épithéliales sont importantes pour la sécrétion et l'absorption des fluides, des électrolytes et des solutés et diffèrent de structure, de fonction selon leur emplacement dans le TGI. C'est dans l'intestin grêle, le duodénum, le jéjunum et l'iléon, que la majeure partie du processus de digestion se produit avec notamment l'absorption des aliments et des électrolytes. La décomposition des protéines, des graisses et des glucides, en plus petits éléments, est effectuée par les enzymes digestives. Ils sont ensuite absorbés par les cellules épithéliales, situées sur les villosités de l'intestin grêle, et rejoignent le réseau de capillaires et vaisseaux lymphatiques. L'ensemble du contenu luminal ne peut pas être entièrement absorbé. Les éléments restants vont atteindre la valve iléo-caecale et se retrouver dans le côlon où l'eau restante va être absorbée la solidification du contenu du côlon effectué, et le stockage des selles avant expulsion.

## - La fonction de barrière du Tractus Gastro-Intestinal

Le transport des matières dissoutes et particulières retrouvées dans le TGI s'effectue de différentes manières régulées : soit entre les cellules épithéliales, soit à travers la membrane apicale de l'épithélium.

Les voies de transport à travers l'épithélium sont diverses et variées et reposent sur la taille des composés :

- **la perméabilité passive**, pour les plus gros composés hydrophiles
- **le transport transcellulaire**, pour les composés lipophiles et les petits composés hydrophiles
- **l'absorption**, pour les nutriments et les électrolytes. L'endocytose, suivie de la transcytose et de l'exocytose, est spécifique aux plus gros peptides, aux protéines et aux particules.

L'épithélium intestinal est, comme énoncé plus haut, une grande surface d'environ 100m<sup>2</sup> qui est bordée par une monocouche d'CEI (cellules épithéliales intestinales), formant une barrière physique solide. Elles sont au cœur du dispositif de protection de l'hôte vis-à-vis du microbiote



et forment une barrière physicochimique très efficace, facilement réparée en cas d'agression grâce à son renouvellement rapide à partir des cellules souches présentes au fond des cryptes (24). Ces cellules assurent plusieurs fonctions indispensables au bon fonctionnement de l'homéostasie intestinale (25). Elles permettent la sécrétion de composés qui influencent la colonisation microbienne, l'échantillonnage du microenvironnement intestinal, la détection des microbes bénéfiques et nocifs, l'induction et la modulation des réponses immunitaires. L'épithélium intestinal de par son anatomie spécifique, peut acquérir et concourir à l'ensemble de ces fonctions. Les CEI permettent la régulation de la colonisation et la pénétration de l'épithélium par les microbes. Ces fonctions sont notamment permises via la sécrétion de peptides antimicrobiens (PAM ou AMP). Les lysozymes, les défensines, les cathélicidines, les lipocalines et les lectines de type C, comme RegIIIy, sont des AMP, produits de manière constitutive mais également de manière inductible, notamment par les cellules de Paneth - un type d'CEI spécialisé situé à la base des cryptes intestinales de l'intestin grêle (26).

L'épithélium intestinal possède un rôle protecteur très important, puisqu'il agit comme une **frontière** entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. La première ligne de défense est acquise et permise par **la production d'acide gastrique, de suc pancréatique et de substances antimicrobiennes dans le TGI**. Le microenvironnement est ensuite retrouvé proche de l'épithélium et présentant des couches d'eau non agitée, le **glycocalyx** et le **mucus** permet d'établir une deuxième ligne de défense. Enfin, on retrouve les cellules épithéliales séparées par des **jonctions serrées**, qui constituent la dernière ligne de défense.

### **1 - Les jonctions serrées**

La perméabilité intestinale permet le passage régulé et de l'absorption des nutriments provenant de la digestion des aliments. Un ensemble complexe de jonctions cellulaires maintient l'intégrité et la perméabilité spécifique de l'épithélium intestinal. Ces jonctions permettent également le passage sélectif de molécules. L'épithélium forme donc une barrière sélective par l'intermédiaire de trois types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, les desmosomes, les jonctions adhérentes.

Le transport entre les cellules épithéliales se produit via les **jonctions serrées**. Comme le transport via l'épithélium, ce transport est régulé par des signaux intra et extracellulaires, qui permettent de maintenir les jonctions serrées sous surveillance et de garantir leur bon fonctionnement ainsi qu'une bonne perméabilité intestinale. Ces jonctions constituent la principale structure permettant de réguler la perméabilité paracellulaire assurée au niveau des muqueuses (27). Elles déterminent la taille des pores permettant le passage des molécules de faibles poids moléculaires (28). On y retrouve des cellules épithéliales présentant des jonctions serrées basolatérales (zonula occludens), indispensables pour restreindre, assurer et maintenir une bonne perméabilité trans-épithéliale en empêchant le passage de pathogènes (29). **Les jonctions serrées** assurent l'étanchéité entre deux tissus, et laissent passer certains peptides plutôt petits et hydrophiles lors de la digestion. Elles se retrouvent à l'apex des cellules épithéliales et forment une bande continue.

Le développement de ces jonctions est sous le contrôle de plusieurs types de protéines et résulte en l'assemblage de différentes protéines :

- **la famille des Claudines** : elles forment un véritable pore paracellulaire au sein de la jonction en s'associant et se complexant aux occludines, autres protéines transmembranaires. Cet agrégat protéique va se lier **aux molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM)**.
- ce complexe préalablement formé va se lier à d'autres protéines de **la famille des Zonula Occludens**, notamment ZO-1 et ZO-2 et ZO-3. Elles se fixent entre elles ainsi qu'au cytosquelette d'actine. Un réseau de fibrilles est alors formé, et va fixer le domaine apical des cellules épithéliales au cytosquelette. Le rapprochement des deux membranes plasmiques voisines est alors permis.

La barrière intestinale peut également adhérer à des structures tissulaires. Elle établit **des jonctions dites jonctions cellulaires**, permettant au cytoplasme de se lier au cytosquelette d'actine. C'est notamment le cas au niveau des desmosomes, qui se forment au pôle basal de l'espace intercellulaire. Ils se constituent en effectuant des interactions, liaisons entre la desmoglérine, la desmocolline, desmoplakine et les filaments de kératine (30).

## **2 - Le mucus :**

Les muqueuses en plus d'être recouvertes de cellules épithéliales fournissant des jonctions serrées, présentent une couche de mucus, recouvrant l'intégralité de leur surface.

Dans le côlon, où la densité des bactéries est maximale, le nombre de cellules à mucus augmente considérablement, la formation d'un film muqueux épais apparaît alors. Il se constitue de deux couches : une couche externe fluide, où les bactéries vont trouver les substrats nécessaires à leur croissance, et une couche interne très dense presque stérile, limitant les contacts directs des bactéries avec la surface épithéliale (31). Ce gel permet l'échange de molécules, protège et hydrate les épithéliums. De par sa viscoélasticité, il permet également la filtration de certaines particules et pathogènes et limite leurs accès au TGI. De plus, il permet de protéger l'épithélium stomatique des sucs gastriques et de leur acidité.

Sa composition est spécifique, puisqu'il possède des mucines transmembranaires mais également des mucines sécrétées. Ces molécules sont des protéines oligomériques glycosylées de masse moléculaire élevée. Elles retiennent une grande quantité d'eau (représentant 95 % du poids total) et donnent ainsi ses propriétés physicochimiques à ce gel de mucus. Il est également constitué d'acides nucléiques, de lipides, de sels, de petites protéines et de débris cellulaires (32).

Une de ces caractéristiques est qu'il est poreux. Cette spécificité justifie son utilité ainsi que sa nécessité dans la fonction de barrière intestinale. En effet, selon la taille de ses pores (qui varie en fonction des voies empruntées), le passage des grosses particules va être bloqué et ce par exclusion stérique. Grâce à la présence des acides sialiques et des mucines présentant des parties hydrophobes, certains éléments sont retenus et ne passent pas la barrière intestinale. Certains motifs glucidiques bactériens peuvent également être reconnus et fixés par les glucides retrouvés sur les mucines, établissant une nouvelle fois le rôle de barrière de cette couche de gel (33).

Le mucus varie également d'épaisseur (de 15  $\mu\text{m}$  dans les voies aériennes à plusieurs centaines de microns dans le côlon), de pH (de 7,4 dans les poumons, et entre 3,5 et 4,5 dans l'estomac), et de viscosité (élevée dans le vagin, faible dans les voies nasales). Ces différentes caractéristiques lui permettent de maximiser sa qualité de barrière et donc de gérer au mieux son franchissement par les éléments étrangers potentiellement pathogènes (34) (35).

Cette couche de mucus est en renouvellement perpétuel. Ce mécanisme continu de turn-over est permis grâce à la clairance mucociliaire. Grâce au péristaltisme intestinal ou grâce aux mouvements des cils présents au niveau des cellules épithéliales, les couches supérieures de mucus sont déplacées et éliminées. En parallèle, la sécrétion de nouvelles mucines par les cellules des glandes sous-mucosales et les cellules caliciformes (ou goblet cells) est également observée (36). Le mucus des voies respiratoires et son contenu sont ainsi éliminés et dégradés par le tractus gastro-intestinal (TGI), et celui des voies intestinales est, quant à lui, éliminé hors de l'organisme. Ce temps de clairance mucociliaire, propre à la composition et la spécificité de chacune des muqueuses, varie. Il peut aller de 15 minutes pour la muqueuse nasale à plusieurs heures pour le TGI (35).

Le mucus possède également d'autres caractéristiques lui permettant d'assurer le bon fonctionnement de la barrière intestinale en éliminant les pathogènes par des mécanismes non spécifiques. Il contient un grand nombre d'enzymes (lysozymes, amylases...), d'immunoglobulines et de peptides antimicrobiens (protéines du complément, défensines...) sécrétés par les cellules mucosales permettant le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (37, 38) : une diminution de la population cellulaire induite dans la sécrétion de mucine, les cellules caliciformes, était une caractéristique des MICI. En effet, dans les modèles animaux où la principale mucine, MUC2 est délétée, une colite spontanée est observée (12, 25, 39).

La couche de mucus possède, donc, un rôle crucial dans l'établissement et la garantie de l'homéostasie intestinale. Chez l'Homme, des altérations des cellules de Paneth et des cellules à mucus sont respectivement mises en cause dans la pathogenèse de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique (31, 40).

## - La Fonction immunitaire

Les muqueuses intestinales présentent également **une barrière immunologique**. Cette fonction associée aux cellules épithéliales, est également présente dans les muqueuses par l'existence d'une population cellulaire immunitaire spécifique. Ces dernières captent et éliminent les pathogènes pouvant et voulant pénétrer, dans la lumière intestinale. Le rôle de cette barrière immunologique est de sonder l'environnement intestinal en détectant la présence de micro-organismes. Suite à cela, ces populations de cellules immunitaires engendrent soit une tolérance immunitaire vis-à-vis des micro-organismes reconnus (c'est par exemple le cas pour la flore bactérienne commensale ou les allergènes du bol alimentaire), ou soit, elles sécrètent des immunoglobulines (IgA sécrétoires) pour les repousser (41).

Chez **un individu sain**, la réponse immunitaire du microbiote intestinal se fait uniquement à **la surface mucosale**. Une seule couche d'épithélium sépare la lumière intestinale des autres tissus, où se trouve le mucus, qui, lui, sépare l'épithélium intestinal des microbes résidents (42). Cette barrière de mucus est majoritairement organisée autour d'une mucine hyperglycosylée : MUC2. Elle assure cette fonction de barrière et bouclier mais elle limite, également, l'immunogénicité d'antigènes intestinaux en orientant certaines cellules dendritiques intestinales (CD) vers un état anti-inflammatoire (43). Cette barrière, autrement appelée tissu lymphoïde associé aux muqueuses (**MALT pour Mucosal Associated Lymphoid Tissue**), est, à la fois composée de cellules dendritiques, de macrophages et de lymphocytes T et B, aboutissant en un système organisé diffus (44).

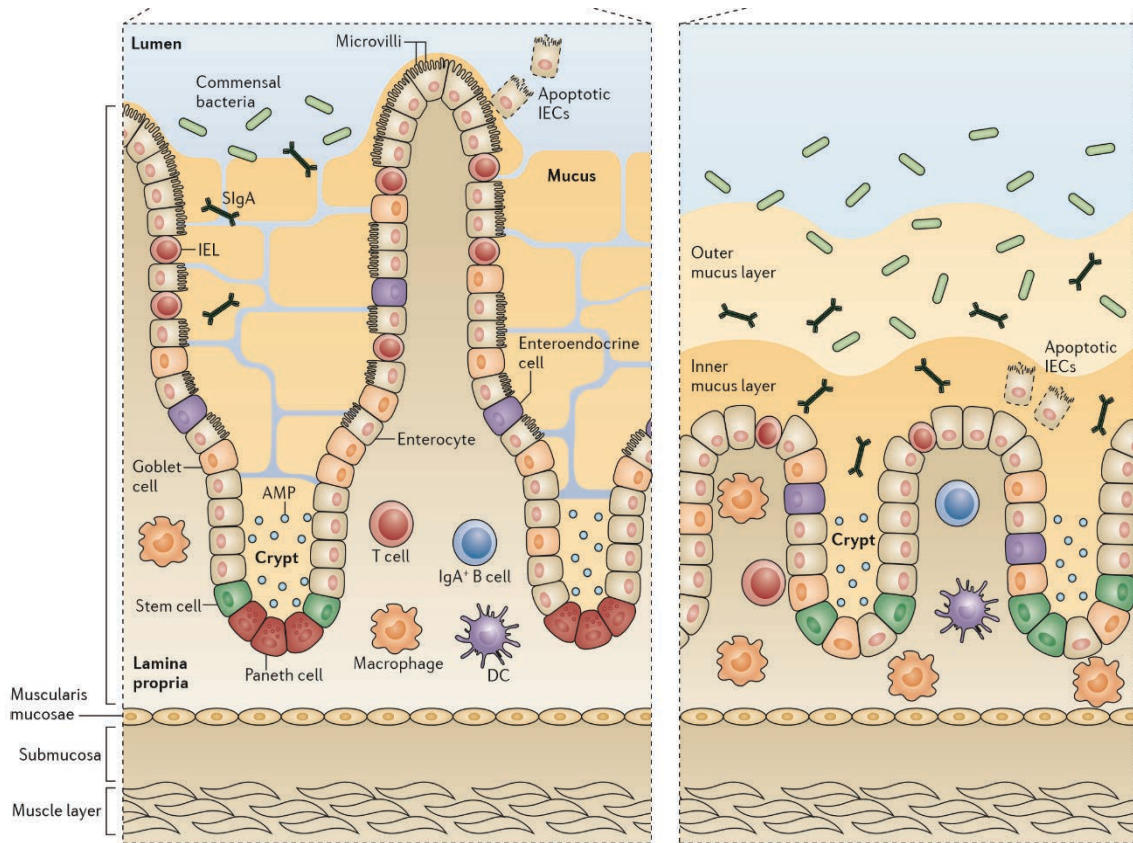
Cet ensemble cellulaire est principalement présent sous la membrane basale de l'épithélium mais certaines sont présentes entre les cellules épithéliales puisqu'elles peuvent posséder des prolongements. Ces cellules travaillent en étroite collaboration avec les cellules M (ou Microfold cells), spécialisées dans la captation de pathogènes. Cette captation des antigènes par les cellules M et les cellules présentatrices d'antigènes CPA (cellules dendritiques et macrophages), ainsi que leur présentation aux différents lymphocytes, induit localement une réponse immunitaire innée puis adaptative.

Les cellules épithéliales de l'intestin contrôlent et influencent l'homéostasie intestinale via la sécrétion de cytokines affectant la réponse immunitaire adaptative des cellules dendritiques (25). **En condition saine**, ces facteurs maintiennent un état d'hyporéactivité vis-à-vis des bactéries commensales et donc de tolérance. Par exemple, les cytokines exprimées de manière constitutive par les CEI, vont limiter la production de certain type de cellules dendritiques, de l'IL-12 et de l'IL-23 et vont favoriser la sécrétion d'IL-10. Cela empêchant l'orientation du système immunitaire vers la voie T helper 1 (TH1) et favorisera, ainsi, l'induction d'une réponse de type Treg (45).

### **3 – Le système immunitaire intestinal**

Le système immunitaire intestinal possède une caractéristique particulière, il établit une **tolérance immunitaire** vis-à-vis de certains éléments constitutifs du TGI nécessaires à son bon fonctionnement. Elle est possible et notamment effectuée envers une large source de micro-organismes non pathogènes pour l'hôte. Il préserve la réponse immunitaire nécessaire et produite lors d'une infection de pathogènes ou d'une intrusion bactérienne.

Chez les mammifères, le tractus gastro-intestinal contient un nombre et une variété considérables de **cellules immunes d'origine hématopoïétique**, disséminées dans la zone sub-épithéliale (la lamina propria ou chorion), qui coopèrent avec l'épithélium pour renforcer la barrière intestinale. **Phagocytes, cellules dendritiques et cellules lymphoïdes innées participent à l'immunité innée**, rapidement mobilisable. **Les lymphocytes T et B**, plus lents à mobiliser mais apportant spécificité et mémoire, sont les acteurs de **l'immunité adaptative**. Le recrutement et l'activation de l'ensemble de ces cellules sont très dépendants des signaux provenant du microbiote et sont étroitement régulés (figure 5).



**Figure 5 : Anatomie de la muqueuse intestinale et son appareil immunitaire**

A - Représentation de l'organisation d'une villosité et cryptes intestinales dans le jejunum.

B - Représentation de l'organisation d'une crypte dans le colon.

L'intestin grêle, illustré par le jejunum, possède de longues villosités minces recouvertes d'un épithélium possédant une bordure en brosse étendue comprenant les microvillosités qui contiennent des enzymes digestives, apportant une surface étendue pour la digestion et l'absorption des métabolites de l'alimentation. Les cellules épithéliales intestinales (IEC) sont produites à partir de cellules souches situées près du fond des cryptes. Après quelques jours, elles se retrouvent en haut des villosités et sont remplacées par de nouvelles cellules depuis les cryptes. Les cellules souches des cryptes donnent naissance aux cellules caliciformes sécrétant du mucus retrouvé sur les villosités et aux cellules de Paneth, migrant vers le fond de la crypte. Ces cellules de Paneth se caractérisent par la présence de granules denses contenant des peptides antimicrobiens (AMP). La partie centrale des villosités comprend la lamina propria, où se trouvent la majorité des cellules immunitaires intestinales, les lymphocytes intraépithéliaux (IEL) se trouvent, eux, entre les cellules épithéliales. Les villosités deviennent progressivement plus courtes et plus larges sur toute la longueur de l'intestin grêle. Les cellules caliciformes et les cellules de Paneth deviennent plus nombreuses et les IEL progressent moins le long de l'intestin grêle.

Le caecum fait suite à l'intestin grêle, c'est un sac à extrémité aveugle comprenant la première partie du gros intestin, il n'a pas de villosités et la muqueuse se compose principalement de cryptes. Le caecum débouche dans le côlon ascendant (proximal), puis le côlon transverse, le côlon descendant (distal) et le rectum. Les villosités sont absentes de toutes les parties du côlon et les cryptes sont plus petites que celles trouvées dans l'intestin grêle ; la fonction principale de l'épithélium de surface est de réabsorber l'eau des fèces et d'agir comme une barrière au microbiote commensal, facilité par le grand nombre de cellules caliciformes, qui produisent une couche étendue et épaisse de mucus protecteur (voir le texte pour plus de détails). Les cellules de Paneth sont très rares dans le côlon et les IEL sont beaucoup plus rares que dans l'intestin grêle.

DC, cellule dendritique ; SIgA, immunoglobuline sécrétoire A.(9)

## - **Systeme Immunitaire Inné**

Les cellules immunitaires qui, dans le tube digestif, constituent le premier rempart de défense sont les **polynucléaires et les monocytes** établissant une réponse immunitaire innée peu spécifique. Ces cellules sont rapidement recrutées dans les tissus infectés et détruisent les bactéries en les phagocytant ou en produisant des substances qui les tuent.

### **1 - Les phagocytes**

En **situation physiologique** les macrophages  $CD11b^+CX_3CR1^{hi}$  (*C-X3-C motif chemokine receptor 1*), sous population de phagocytes, sont **les cellules les plus nombreuses** (46). Ils sont constamment renouvelés à partir des monocytes sanguins et se différencient dans l'intestin où leur activité de phagocytose s'acquiert pour devenir producteurs d'IL-10 (interleukine 10), cytokine anti-inflammatoire clé dans le maintien de l'homéostasie intestinale (47). L'IL 10 permet aux macrophages d'être tolérants aux signaux pro-inflammatoires induits par les motifs bactériens, pour effectuer un tri dans les bactéries et éliminer celles qui franchissent l'épithélium sans provoquer de réponse inflammatoire délétère (46). Lors d'une infection, des monocytes sanguins non préalablement conditionnés, sont recrutés localement. Ils seront capables de produire en grandes quantités des cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) leur permettant de participer à l'élimination des bactéries potentiellement pathogènes initiatrices de ces signaux inflammatoires (46).

### **2 - Les éosinophiles**

En complément, on retrouve une autre population cellulaire, présente même en condition physiologique : les **éosinophiles**. Ils participent à l'homéostasie intestinale et semblent favoriser le déclenchement d'une réponse immune adaptative par la production d'immunoglobulines (IgA) (48).

### **3 - Les neutrophiles**

Cette population, contrairement aux éosinophiles, est normalement peu nombreuse mais est très fortement recrutée **au cours des colites infectieuses**. Ils concourent à l'élimination de bactéries ayant pénétrées et traversées l'épithélium et donc à sa protection (49).



#### **4 - Les cellules lymphoïdes innées**

Les cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cells*, **ILC**) constituent 1 à 2 % des cellules hématopoïétiques de l'intestin. Cependant, malgré leur faible nombre, elles y jouent un rôle important. Elles permettent **d'initier et d'orienter les réponses immunes intestinales** (50). Elles se distinguent des lymphocytes T et B, puisqu'elles ne possèdent pas de récepteur de reconnaissance des antigènes. Leur activation est permise par un autre mécanisme : des cytokines produites par l'épithélium ou par les cellules dendritiques, en réponse aux modifications de l'environnement en sont responsables. Parmi les ILC, les ILC de type 3 (ILC3), caractérisées par l'expression du facteur nucléaire ROR $\gamma$ t (*retinoid acid-related orphan receptor  $\gamma$ t*), sont importantes puisqu'elles possèdent des interactions caractéristiques avec le microbiote (50).

Ces cellules jouent un rôle important dans la construction et la régulation de la barrière immune intestinale puisqu'elles permettent la production du facteur de nécrose tumorale, la lymphotoxine, qui est indispensable à la formation des tissus lymphoïdes, présentant les réponses immunes adaptives.

Les ILC3 vont également sécréter de l'IL-22. Elles vont donc stimuler la production de mucus et de peptides antimicrobiens par l'épithélium, et permettre sa réparation. L'IL-23, produite par les cellules dendritiques en réponse aux signaux bactériens et par l'épithélium en cas d'agression, va contrôler la production et sécrétion de l'IL 22 (50). Les ILC3 favorisent, également, la différenciation des cellules dendritiques intestinales et vice-versa (51). Enfin, ces ILC3 peuvent également jouer le rôle de CPA, comme les cellules dendritiques. Elles expriment des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et pourront donc présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pour les activer.

Ces ILC sont donc nécessaires au bon fonctionnement et à la régulation de la barrière immune intestinale, mais, lorsqu'elles sont activées excessivement, elles peuvent induire une inflammation pathologique suite à une surproduction d'interféron (IFN)  $\gamma$  et d'IL-17, cytokines pro-inflammatoires. Un contrôle de leur activité est donc nécessaire et est effectué par l'IL-25 produite par l'épithélium (52).

## **5 - Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques intestinales sont des **éléments clés indispensables à l'induction des réponses immunes adaptives**. Ces cellules dendritiques peuvent rester dans la muqueuse ou migrer par le réseau lymphatique vers les ganglions mésentériques, pour y recruter des lymphocytes naïfs, les activer et induire des récepteurs de « *homing* » permettant ainsi leur orientation vers l'intestin (53). Chez la souris, les cellules dendritiques dérivent d'un précurseur médullaire commun et se caractérisent par l'expression de CD103 et CD11c (53). Une sous-population de cellules CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (n'exprimant pas l'intégrine CD11b) est largement retrouvée dans les plaques de Peyer. Cette sous-population pourrait favoriser la génération de lymphocytes T régulateurs, grâce à la production d'acide rétinoïque. La sous-population exprimant l'intégrine CD11b, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, favoriserait, quant à elle, plutôt la génération de réponses T pro-inflammatoires (53).

### **- Système Immunitaire Adaptatif**

Cette réponse innée est relayée par une réponse plus spécifique et affine déclenchée par les cellules dendritiques, les principales cellules présentatrices d'antigènes. Elles vont pouvoir entrer en contact avec les micro-organismes de la lumière intestinale i) via leurs prolongements émis à travers l'épithélium intestinal, ii) via un contact direct avec les protéines alimentaires ayant traversées cet épithélium. Elles vont alors capter les micro-organismes et les protéines puis les digérer en fragments ou peptides, qu'elles vont présenter aux molécules d'histocompatibilité et exposer à leur surface. Suite à cette présentation, elles vont migrer vers les ganglions lymphatiques (plaques de Peyer) où elles présenteront ces peptides antigéniques aux lymphocytes T pour induire leur activation et donc produire une réponse inflammatoire adaptée. Au niveau du tube digestif, elles sont majoritairement retrouvées **dans les plaques de Peyer, et situées sous l'épithélium.**

## **1 - Cellules immunes adaptatives intestinales**

La maturation finale du système immunitaire intestinal est induite par la flore bactérienne commensale et par la présence d'antigènes intraluminaux. Elle se caractérise par l'abondance massive de lymphocytes matures effecteurs, T et de plasmocytes dans la muqueuse intestinale (54).

### **A - Les plaques de Peyer (PP) et les follicules lymphoïdes isolés (ILF)**

Ce sont les sites privilégiés de l'initiation des réponses immunes adaptatives. Les ILF sont de petites formations lymphoïdes se développant après la naissance suite à la présence de signaux du microbiote (55, 56). L'épithélium de ces structures est fortement enrichi en cellules M. De par sa spécificité, il permet la transcytose de bactéries pathogènes qui sont ensuite captées par les cellules dendritiques et présentées aux lymphocytes T naïfs. Ils activeront ensuite la différenciation des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'IgA (57).

Les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup>, initiateurs de cette activation lymphocytaire, vont synthétiser de l'acide rétinoïque et permettre à ces lymphocytes d'acquérir des récepteurs membranaires, dits de « *homing* » qui leur permettront de finaliser leur maturation et de retourner dans la muqueuse intestinale. Cette orientation induit leur localisation tissulaire et permet ainsi la colonisation et la protection de la muqueuse sur toute sa hauteur (57).

Les plasmocytes vont produire des IgA suite à une exposition à des bactéries pathogènes, elles sont ensuite transportées à travers l'épithélium, sous forme d'IgA sécrétoires (SIgA) dans la lumière intestinale, et par leur liaison aux pathogènes, elles vont stopper leur migration dans le mucus et leur infection des cellules épithéliales. Leurs interactions avec des récepteurs spécifiques permettant leur reconnaissance, les récepteurs aux immunoglobulines présents sur les membranes basales des cellules épithéliales (pIgR pour Polymeric Immunoglobuline Receptor), vont permettre de les transcytoser vers le pôle apical pour les excréter ensuite c'est ainsi qu'elles pourront se fixer aux bactéries et favoriser leur liaison au mucus (57).

Lors de la colonisation intestinale par les lymphocytes T, une induction de lymphocytes TH17 (*T helper 17*) produisant de l'IL-17 a lieu. Ces lymphocytes T helper, très importants pour le bon fonctionnement et la bonne balance de l'homéostasie intestinale, permettent de contenir les bactéries dans l'intestin. En effet, l'IL-17 va induire la production de peptides antimicrobiens par l'épithélium et favoriser le recrutement de polynucléaires neutrophiles nécessaires à la bonne balance immunitaire (58). L'IL-17 permet, aussi, l'expression du pIgR et, donc par extension, favorise une transcytose efficace des IgA (59). Il existe d'autres sous-populations de lymphocytes T, qui peuvent être pro-inflammatoires ou régulateurs, recrutées en réponse à la colonisation, qui vont également synthétiser des cytokines pour concourir à la bonne homéostasie intestinale. C'est notamment le cas des lymphocytes TH1, produisant de l'IFN $\gamma$ , pour favoriser l'activité phagocytaire des macrophages, ou des lymphocytes T régulateurs induisant la production de l'IL-10, cytokine immunorégulatrice jouant un rôle clé dans le contrôle des réponses pro-inflammatoires (60).

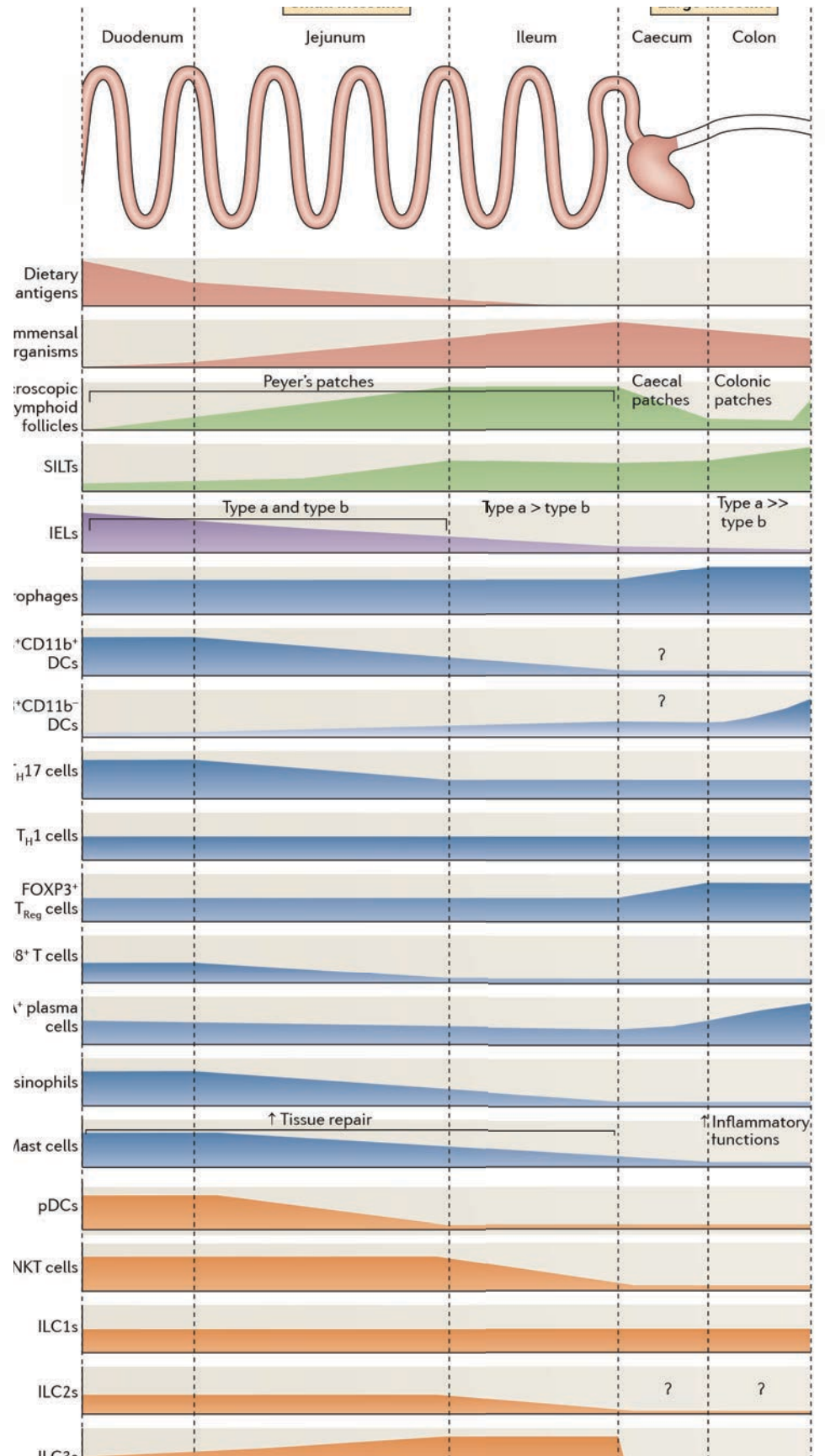


Figure 6 : L'appareil immunitaire varie tout au long du tractus intestinal

La figure montre les différentes spécialisations régionales de l'intestin murin indiquant comment le contenu antigénique (couleur), le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT, vert) et les différentes populations leucocytaires (bleu et orange) varient et changent en fréquence le long du tractus intestinal. Les points d'interrogation indiquent les régions pour lesquelles la spécialisation régionale n'a pas été caractérisée.

DC, cellule dendritique ; FOXP3, boîte à fourche P3 ; IEL, lymphocyte intraépithélial ; ILC, cellule lymphoïde innée ; iNKT, lymphocyte naturel invariant T ; pDC, DC plasmacytoïde ; SILT, tissu lymphoïde isolé solitaire ; TH, T helper. (9)

## - Le Tissu Lymphoïde du Tube Digestif :

**Dans l'intestin**, le MALT (tissu lymphoïde associé aux muqueuses) est spécifiquement appelé **GALT** (pour **Gut Associated Lymphoid Tissue**). On retrouve ce type de tissu dans toutes les muqueuses de l'organisme, le nez, les poumons, etc.

Le **GALT** peut être induit de diverses manières et par des acteurs spécifiques. Les territoires où les éléments exogènes prélevés sont les premiers sites où la réponse immunitaire est induite, on parle de **sites inducteurs**. En effet, la cellule M, de par sa morphologie spécifique (bordure en brosse irrégulière, moins de cils au pôle apical, formation de cryptes membranaires au pôle basal, couche de mucus plus fine...) et grâce à son importante activité d'endocytose, capte les particules ou autres éléments pathogènes qu'elle rencontre et qui se trouvent dans la lumière (61). Elles sont présentes au niveau de certaines régions de l'épithélium : les « **épithélium associé aux follicules** » **FAE** (Follicle Associated Epithelium), et sont en contact avec d'autres types de régions qui présentent une forte densité en cellules immunitaires, les **IFR (Interfollicular Regions)**.

Les **sites inducteurs** du GALT sont concentrés au niveau **des plaques de Peyer (PP)**. On les retrouve principalement au niveau de l'intestin grêle, mais le côlon et le rectum n'en sont pas dépourvus. Ces structures sont organisées en dômes au sommet desquels se trouvent les FAE (62). Sous ces dômes, diverses populations cellulaires sont retrouvées, comme les CPA et les zones riches en lymphocytes T et B, organisées en IFR. Ces IFR contiennent majoritairement plus de zones riches en cellules B qu'en cellules T, favorisant ainsi la réponse humorale. On peut retrouver une centaine d'IFR par PP, toutes liées aux ganglions mésentériques (63), permettant la maturation des lymphocytes. Ils seront ensuite acheminés vers la circulation sanguine par le réseau de vaisseaux lymphatiques présents.

L'élément exogène, après avoir été capté par la cellule M est transcytosé aux CPA sous-jacentes (64). Cette translocation peut se faire grâce aux TLRs exprimés à la surface des cellules épithéliales (65). La sécrétion d'un cocktail de médiateurs pro-inflammatoires, chimiokines, attirant les cellules immunitaires au site de réaction a alors lieu (66).

Les cellules dendritiques, présentement des CPA, captent l'antigène par l'élaboration de prolongements membranaires entre les différentes cellules épithéliales, lorsque les cellules M se font plus rares (67).

Après avoir reçu l'antigène, les CPA vont le digérer, le dégrader et exprimer à leurs surfaces certains de leurs fragments. Elles vont ensuite migrer aux niveaux des IFRs et présenter l'antigène aux lymphocytes présents. Les IFRs sont des régions interfolliculaires, composées de CPA (CD et macrophages), et de zones enrichies en  $L_T$   $CD4^+$  et  $CD8^+$  naïfs (T-cell zones) et en  $L_B$  naïfs (B-cell zones). La reconnaissance de l'antigène présenté se fait notamment entre les CMH et TCR/BCR, et par le biais de cytokines et chémokines immunomodulatrices. Les lymphocytes B vont ensuite entrer en action, dans les sites effecteurs. Ils vont permettre l'établissement de l'immunité mucoale humorale. Les CPA vont donc présenter l'antigène, et si elle est concomitante à la stimulation par les lymphocytes helper de la voie TH2, la maturation des  $L_B$  en plasmocytes sécréteurs d'IgA va pouvoir être effectuée (68).

Les IgA, sont des immunoglobulines de haute affinité, permettant la protection des muqueuses, qui sont constamment exposées à des éléments étrangers. Environ 80 % des plasmocytes de l'organisme sont retrouvés dans cette muqueuse (69). Lorsqu'ils sont matures, ils vont migrer vers la lamina propria de l'épithélium et sécréter des IgA spécifiques au pathogène reconnu. Ces IgA sécrétées peuvent être produites de manière T-cell indépendantes et de manière T-cell dépendantes. Les IgA jouent, alors, un rôle important dans la constitution, l'élaboration du microbiote intestinal et de sa composition (70). La relation entre les IgA intestinaux et le microbiote est mutuelle. Le répertoire d'IgA étant très diversifié, il est sélectionné pour permettre le maintien d'un microbiote à la fois diversifié et bien équilibré (71). En outre, ces anticorps sécrétoires intestinaux possèdent la capacité de recouvrir les bactéries colitogènes, une fois masquées, l'homéostasie intestinale et l'inflammation n'est pas altérée (72).

En l'absence de cellules B, ou d'IgA, l'épithélium intestinal va activer d'autres mécanismes lui permettant de réguler positivement le système immunitaire nécessaire à sa défense.

Les cellules T et particulièrement les LT cytotoxiques matures, vont être recrutées localement pour agir contre les micro-organismes et virus intracellulaires infectant les cellules. Les CD matures vont induire la stimulation des lymphocytes B et T après avoir migrées vers les ganglions lymphatiques drainants et vers la rate. Ces cellules B et T vont pouvoir développer une immunité humorale et cellulaire systémique vis-à-vis du pathogène initiateur en circulant dans l'organisme. Ils pourront également retourner vers la muqueuse inductrice grâce à l'expression de molécules spécifiques, appelées « molécules d'homing ».



## 4 – Particularité du système immunitaire intestinal

### - Le microbiote intestinal

#### 1 - Conditions physiologiques

Le corps humain est colonisé par un grand nombre de microbes comme des bactéries, des champignons, des archées et des protozoaires. L'intestin étant l'organe le plus densément colonisé (73) (74) (75). Le corps humain est colonisé par environ 38 milliards de bactéries ( $3,8 \times 10^{13}$ ) (76). Le tractus gastro-intestinal, qui est l'organe le plus largement et le plus diversement colonisé, semble abriter entre **100 000 et 100 milliards de bactéries par ml de contenu luminal** ( $10^5$ – $10^{11}$ ) selon la région (76). L'ensemble de ce microenvironnement constitue le microbiote (appelé aussi flore microbienne).

La révolution scientifique et technologique a permis à la communauté scientifique de faire de grandes avancées, découvertes et progrès dans la compréhension de notre organisme et de son fonctionnement.

Le séquençage métagénomique des échantillons bactériens, notamment, est une approche méthodologique où l'ADN est séquencé directement à partir d'échantillons sans amplification. Cette technique est de plus en plus automatisée dans les laboratoires pour définir la constitution et la composition du microbiote analysé. Les études de communautés bactériennes sont généralement basées sur la technique de séquençage de l'ARN 16S permettant de séquencer un gène connu au lieu d'un génome complet. Le gène ciblé est l'ARN 16S ribosomal (16s rDNA) qui est spécifique des bactéries, présent chez toutes les espèces et qui contient suffisamment de régions variables pour discriminer chaque espèce.

De plus, la technique d'identification taxonomique, du domaine, du genre et de l'espèce bactérienne, est basée sur les similitudes de séquence des amplicons de l'ARNr 16S par rapport à une base de données de référence. Ces approches ont dévoilé la complexité et la diversité des communautés bactériennes présentes et ont, également, permis de révéler un cloisonnement spatial des communautés commensales. Il existe des sites anatomiques distincts (habitats) hébergeant des communautés microbiennes spécifiques propres à ce microenvironnement ou retrouvées de manière ubiquitaire (77).

En outre, la composition du microbiote peut être définie grâce à l'utilisation de différents indices. La diversité spécifique de la composition d'un échantillon peut être définie comme une mesure de la composition d'un écosystème, en termes du nombre d'espèces et de leurs abondances relatives.

La grande majorité des méthodes proposées pour évaluer la diversité des espèces se basent sur la diversité à l'intérieur des communautés. Il existe **des descripteurs de composition** qui sont basés sur des méthodes spécifiques à la quantification du nombre d'espèces présentes dans un peuplement, un lieu, un prélèvement... et **des descripteurs de la structure des communautés** basés sur les méthodes ciblant la distribution proportionnelle de chaque espèce (une abondance relative des individus, sa biomasse, une productivité, etc).

Les méthodes basées sur la structure sont basées sur la dominance ou sur l'équitabilité de la communauté.

- **La richesse spécifique (S)** est la forme la plus simple pour mesurer la biodiversité d'un échantillon. Cet indice est uniquement basé sur le nombre d'espèces présentes, sans prendre en compte la valeur d'importance en termes de nombre.
- L'estimateur de la richesse spécifique effectué par **l'indice Chao 2**, qui prend en compte le nombre d'espèces rencontrées dans seulement un seul prélèvement, la richesse spécifique et le nombre d'espèces rencontrées dans deux prélèvements.
- **L'indice de diversité de Shannon  $H'$**  est une mesure de la diversité spécifique couramment employée et qui le sera ici pour déterminer la composition des différents microbiotes.
- **L'indice de Simpson** mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce. Sa valeur est comprise entre 0 et 1, 0 pour indiquer le maximum de diversité, et 1 pour indiquer le minimum de diversité. Cet indice de diversité donne plus de poids aux espèces abondantes qu'aux espèces rares.

Le microbiote intestinal est défini comme étant un **écosystème complexe d'organismes qui peuplent l'intestin (78)**. Le génome de cette flore microbienne intestinale semble contenir environ 100 fois plus de gènes que le génome humain (79).

Chez le sujet sain, la flore microbienne intestinale humaine est une communauté dynamique et diversifiée de bactéries commensales, champignons et virus.

Les bactéries, partie intégrante de cette flore, sont connues pour exister en plus de 1 000 espèces différentes (79-81).

Les techniques d'ARNr 16S et de métagénomique ont permis de décrire que la composition du microbiote du tractus gastro-intestinal sain est dominée par les phylums bactériens *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (79).

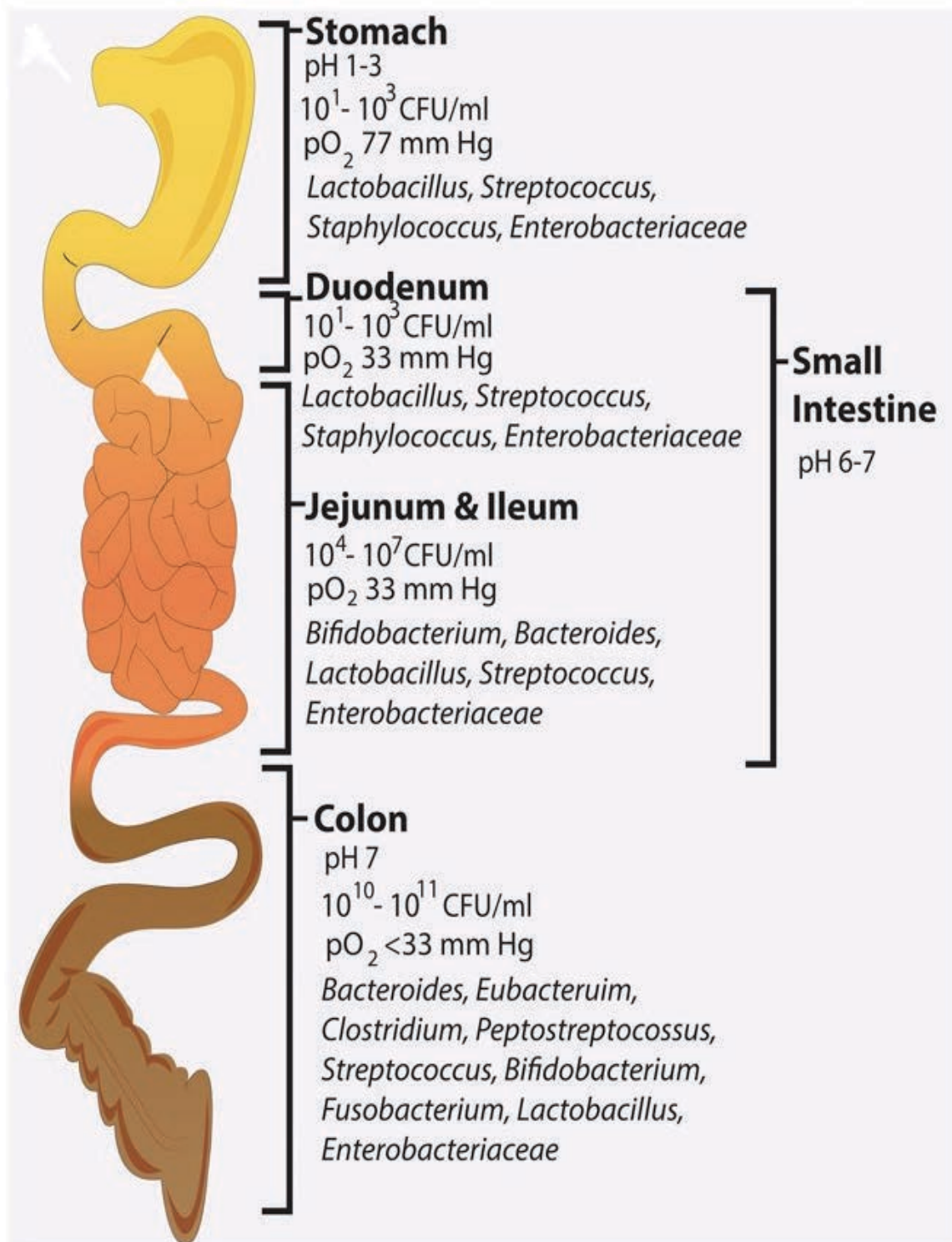
On retrouve plus de 90 % des espèces bactériennes intestinales humaines dans les quatre grandes classes suivantes : ***Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*** (79, 80, 82, 83).

Cependant, le microbiote intestinal reste malgré tout **singulier à chaque individu**, expliquant donc l'existence d'une différence significative dans cette diversité microbienne (84).

La diversité du microbiote intestinal humain montre des variations interpersonnelles, qui sont dues à la génétique mais également à une exposition à divers facteurs environnementaux, comme le mode de vie et l'alimentation (75, 85, 86).

En outre, **la diversité et la richesse bactérienne du microbiote est variable en fonction du segment du TGI (figure 7)**. La diversité et la concentration en microorganismes sont croissantes de l'estomac au côlon. L'estomac abrite un faible nombre et peu d'espèces, tout comme la partie supérieure de l'intestin grêle. Du jéjunum au colon, le nombre de bactéries augmente progressivement (87). Le côlon abritant, quant à lui le plus de populations bactériennes et présentant les populations les plus actives métaboliquement (88).

Les facteurs environnementaux, comme la nutrition, le mode de vie, les toxines et autres facteurs exogènes ont une certaine influence sur l'abondance de ces dernières. Des études ont démontré que les trois premières années de vie sont nécessaires à la maturation du microbiote intestinal, retrouvé à l'âge adulte, à sa stabilisation dans la charge et la diversité microbienne (89).



La localisation et l'organisation spatiale de la composition bactérienne du microbiote intestinal n'est pas uniforme le long du tractus gastro-intestinal. Cet écosystème intestinal dynamique se compose de nombreuses caractéristiques uniques, comme les gradients de pH, les tissus microbiens interagissant pour effectuer des biotransformations microbiennes. La plus forte densité de bactéries est présente dans le gros intestin, avec des estimations récentes de  $10^{13}$  de cellules bactériennes du gros intestin. Ces bactéries sont probablement les plus importantes pour l'homéostasie et résident avec un pH moyen de 6,4 à 7 et un redox inférieur potentiel que les autres niches gastro-intestinales. Les pressions partielles d'oxygène le long du tractus gastro-intestinal contribuent également à ces niches métaboliques(3)

Le microbiote intestinal possède **une relation symbiotique mutuelle avec l'hôte**, qui est fondamentale pour le développement et l'élaboration du système immunitaire, pour le maintien de l'intégrité des tissus ainsi que l'homéostasie du système immunitaire.

En effet, l'hôte va lui procurer un habitat et un environnement stable et riche en nutriments, tandis que le microbiote intestinal, lui, va soutenir l'hôte par diverses fonctions physiologiques (comme la fermentation des composants alimentaires assurant la génération de nutriments, de vitamines et de métabolites) garantissant un bon état physiologique. Les organismes microbiens vont, donc, vivre et établir une relation de type « mutualiste » avec l'hôte.

Des études sur des souris germ-free et traitées aux antibiotiques ont énormément contribué à l'apparition et l'élaboration du **concept d'hôte-bactéries**, la symbiose dans l'intestin et son importance dans l'homéostasie tissulaire. Par exemple, reconstituer le microbiote de souris par une simple transplantation fécale est suffisant pour restaurer l'immunité des muqueuses (90).

Comme vu précédemment, les fonctions du TGI sont des fonctions à la fois métaboliques, trophiques et protectrices. Il a été démontré que la digestion et l'absorption des nutriments, la protection contre les pathogènes et la réponse immunitaire, la prolifération des cellules épithéliales intestinales sont bien effectuées grâce à la flore intestinale, essentielle pour leur maintien.

Dans des **conditions physiologiques normales**, le microbiote intestinal agit comme un **organe homéostatique (figure 8)**. En plus de maintenir l'homéostasie tissulaire, les ligands des bactéries commensales et leurs sous-produits métaboliques peuvent influencer et affiner le développement normal et les fonctions du système immunitaire muqueux, et protéger contre des infections bactériennes et virales (91, 92).

Il est notamment impliqué dans la fermentation du complexe de polymères polysaccharidiques non digérés, il permet la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), la synthèse de vitamines, la production d'énergie, le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale, et enfin l'exclusion des microbes pathogènes (93-96).

## LES ACIDES GRAS À CHAÎNE COURTE – DES MÉTABOLITES BACTÉRIENS IMMUNOMODULATEURS

Plusieurs facteurs comme la génétique, l'âge et l'alimentation sont connus pour impacter la composition du microbiote intestinal (82). L'alimentation joue un des rôles les plus déterminants dans la formation du microbiote intestinal (97).

Une étude comparative entre différents régimes alimentaires vient confirmer ces informations. En effet, lors d'une comparaison de la constitution du microbiote intestinal suite à l'administration de deux types de régimes, africains et européens, chez des enfants, il a été observé que le régime africain, riche en fibres mais pauvre en protéines et en graisses animales, entraînait un enrichissement du genre *Prevotella* dans l'intestin, tandis que le régime européen, riche en protéines et en graisses, induisait une forte prévalence du genre *Bacteroides*. Le régime africain induit l'augmentation en nombre de certaines bactéries porteuses des gènes capables de fermenter les fibres et conduisant à la production d'AGCC (par exemple l'acétate, le butyrate et le propionate), possédant des **propriétés anti-inflammatoires** (98, 99).

Les acteurs du microbiote intestinal les bactéries, vont produire des métabolites spécifiques appelés **les AGCC : acides gras à chaîne courte (acétate, propionate et butyrate)** ou **SCFA** (short chain fatty acids). Ils vont favoriser le recrutement ainsi que la maturation des cellules immunitaires permettant de protéger l'organisme contre une infection, une inflammation (100). Ils influencent également les activités métaboliques de l'hôte, puisqu'ils permettent de faire un lien entre les fibres retrouvées dans le bol alimentaire, les espèces bactériennes commensales et l'hôte (101-103). Les AGCC sont produits dans l'intestin et sont distribués de manière systémique dans l'organisme pour ensuite être utilisés en tant que fournisseur d'énergie ou comme molécules de signalisation (104).

Les AGCC sont des éléments importants et essentiels au bon maintien de l'équilibre homéostatique du tractus gastro-intestinal. Ils peuvent moduler divers aspects de ces lignes de défense afin de préserver l'immunité des muqueuses. Ils améliorent et permettent d'assurer la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales (IEC) par une différenciation croissante des cellules, la production de mucus par les cellules en gobelet et permettent le renforcement de la perméabilité des jonctions serrées (105, 106). Des études *in vitro* et *in vivo* ont indiqué qu'une teneur plus élevée en butyrate conduit à une production accrue de mucine, réduisant l'adhérence des bactéries et améliorant l'intégrité épithéliale (107, 108). Les AGCC présents dans l'intestin diminuent, également, le pH luminal, et réduisent alors la croissance des micro-organismes pathogènes. La production d'acétate par les bifidobactéries inhibe la croissance des entéropathogènes chez la souris (109). Ils permettent, aussi, la production intestinale d'IgA, en améliorant le métabolisme des lymphocytes B plasmiques et leur différenciation, dans le but ultime de protéger l'intestin de l'inflammation (110).

Les mécanismes anti-inflammatoires maintenant l'homéostasie intestinale, comme l'action du butyrate sur les voies de signalisations anti-inflammatoires afin de supprimer l'inflammation intestinale et d'inhiber le développement du cancer du côlon, sont également permis par ces AGCC (111).

En outre, les données scientifiques montrent que les SCFA influencent le développement des cellules dendritiques et des cytokines inflammatoires et régulent les macrophages intestinaux (112).

De plus, **certains membres constitutifs du microbiote intestinal sont des éléments clés** pour le bon maintien et fonctionnement de l'homéostasie intestinale. En effet, de par leurs propriétés distinctes, ces bactéries sont considérées comme spécifiques du système immunitaire de l'hôte (39, 84, 113). Des données confirment la présence dans nos organes à la fois des bactéries mais également de leurs produits, pour réguler le système immunitaire vers une homéostasie saine.(114). Des études sur des modèles murins suggèrent que le microbiote intestinal joue un rôle dans l'homéostasie immunitaire et l'inflammation des muqueuses.

En particulier, au niveau de l'équilibre TH17/Treg, qui est considéré comme un facteur d'induction et d'inhibition de l'inflammation colique (115).

## **2 - Conditions pathologiques**

Un nombre croissant de maladies est associé à **une altération du microbiote intestinal et par conséquent à une dysbiose intestinale (figure 8)**. C'est notamment le cas du Syndrome de l'intestin irritable (SII) et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

L'implication du microbiote intestinal dans la pathogenèse des MICI a été démontrée dans la littérature scientifique. Il est aujourd'hui admis que la composition du microbiote intestinal diffère entre les patients atteints de MICI et les patients sains. Cela se traduit majoritairement au niveau de la diversité de la flore bactérienne mais également au niveau de l'abondance relative des taxons bactériens. Le **microbiote intestinal des patients atteints de MICI** présente une diminution des bactéries aux capacités anti-inflammatoires et une augmentation des bactéries aux capacités inflammatoires (100, 116). Les *Firmicutes* sont diminués (116-118) et les *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*, elles, sont augmentées (116, 118).

*F. prausnitzii*, appartenant à *Clostridium*, présente un effet anti-inflammatoire et permet la production du butyrate. Les souches *F. prausnitzii*, *Blautia faecis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus torques* et *Clostridium lavalense* sont diminuées dans le microbiote des patients atteints de MC (119, 120). Un lien de corrélation entre le défaut de colonisation de *F. prausnitzii* et la présence d'une MC a été démontré puisque *Faecalibacterium prausnitzii* est retrouvée en quantité réduite dans les selles des patients avec la maladie de Crohn (121, 122). De plus, Sokol and al, ont observé que les cellules mononucléées du sang stimulé par *F. prausnitzii* induisent la production d'IL-10 et inhibent la production de cytokines inflammatoires, comme l'IL-12 et IFN- $\gamma$  (122, 123).

En outre, une baisse significative de *Roseburia spp* a été observée dans le microbiote intestinal de personnes saines mais qui présentent une prédisposition élevée au développement de MICI. En revanche, une augmentation relative des protéobactéries, principalement *E. coli*, est observée chez les patients atteints de MC (124-126) (127) (128).

Il a été rapporté que le nombre d'AIEC (Adherent-Invasive *E.Coli*) est augmenté d'environ 38 % chez les patients atteints de MC contre 6 % chez les sujets sains (83, 87, 129).



Ces entérobactéries ont été retrouvées au sein de la muqueuse iléale des patients atteints de la maladie de Crohn. Elles ont également été proposées, comme de potentiels pathobiontes, puisqu'elles peuvent se répliquer dans les cellules épithéliales in vitro (130).

*Fusobacterium nucleatum* est associé au développement de la rectocolite et au développement du cancer colorectal (131, 132).

Dans le tractus gastro-intestinal sain, un gradient d'oxygène existe en raison de la diffusion de l'oxygène de la muqueuse de l'hôte dans la lumière intestinale (133, 134).

Les bactéries adhérentes à la muqueuse ont donc une tolérance à l'oxygène plus élevée (133). Comme l'inflammation correspond à un état oxydant, la croissance de pathobiontes aérotolérants comme les *Protéobactéries* et les *Actinobactéries* est favorisée. En effet, l'agent pathogène *Citrobacter rodentium* favorise la respiration aérobique de l'épithélium et augmente l'oxygénation de la muqueuse chez la souris (135). Plusieurs études ont montré que l'inflammation intestinale induit la production de petites molécules établies comme étant des accepteurs d'électrons pour les bactéries anaérobies facultatifs (136, 137).

L'augmentation du nombre de bactéries pathogènes pouvant adhérer à la surface de l'épithélium intestinal va affecter la perméabilité de l'intestin, modifier la diversité et la composition du microbiote intestinal, et induire des réponses inflammatoires par une régulation génétique des systèmes inflammatoires aboutissant à l'induction de l'inflammation intestinale (138).

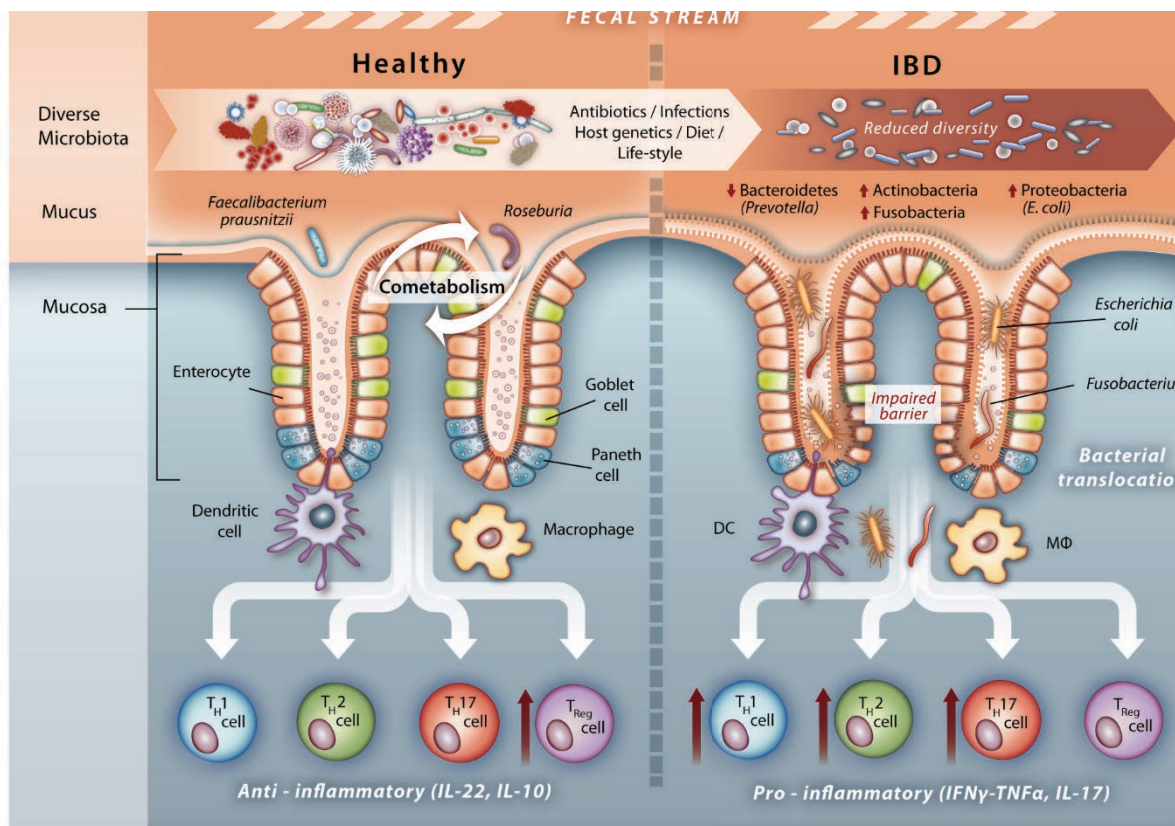
De plus, une abondance accrue des bactéries associées aux muqueuses est également retrouvée au sein de différentes études sur les MICI (139-141). L'augmentation du nombre de bactéries mucolytiques, comme *Ruminococcus gnavas* et *Ruminococcus torques* dans les MICI, peut être à l'origine de cette poussée bactérienne mucosale (139).

Si une dysbiose est observée, une modification de la constitution du microbiote intestinal est également observée, une altération de la production de métabolites s'en suit donc. L'ensemble est associé à la pathogenèse des MICI.

Par exemple, les *F. prausnitzii* de *Clostridium* IV, XIVa, XVIII vont produire du butyrate et entraîner une diminution de la concentration d'AGCC chez les patients atteints de MICI (120). Cette diminution altère la différenciation et l'expansion des cellules Treg et la croissance des cellules épithéliales, jouant un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale (142).

De plus on observe que le nombre de bactéries sulfato-réductrices, comme *Desulfovibrio*, est plus élevé chez les patients atteints de MICI (143, 144). Elles permettent la production de sulfate d'hydrogène, endommageant les cellules épithéliales intestinales et induisant une inflammation des muqueuses (143, 145).

Corrélées ensemble ces données indiquent fortement que l'altération du microbiote intestinal est associée à la pathogenèse des MICI (pathologie développée dans un paragraphe ci-dessous).



A- Lors d'un état physiologique sain, le microbiote est diversifié. Les cellules caliciformes produisent une épaisse couche de mucus, qui crée une barrière physique contre le microbiote, mais abrite également un microbiote résident. Les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages (MΦ) prélèvent des microbes et induisent un profil de lymphocytes T dominé par les lymphocytes Treg producteurs d'IL-10 conduisant à l'homéostasie.

B - En condition pathologique, la composition du microbiote est moins diversifiée chez les patients atteints de MICI avec moins de *Bacteroidetes* et l'expansion des actinobactéries, des protéobactéries telles que les *E. coli* invasifs adhérents et les *Fusobactéries*. La fonction de la muqueuse est altérée. Une réduction du nombre de cellules caliciformes ainsi que leurs fonctions sont altérées - sécrétion de substances antimicrobiennes et de mucus - et vont entraîner une diminution de l'épaisseur du mucus, une réduction de l'intégrité de la muqueuse et une altération de la fonction barrière. La translocation bactérienne est augmentée et l'activation des DC et des MΦ est stimulée, induisant ensuite un profil de cellules T altéré avec une augmentation des Lymphocytes Th1 producteurs d'IFNγ/TNFα, Th2 producteurs d'IL-6/TNFα et Th17 producteurs d'IL-17 entraînant une réponse et des lésions tissulaires. (€

## - **Contrôle de l'homéostasie intestinale, élément essentiel pour l'équilibre immunitaire**

### **1 - Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires et l'homéostasie intestinale**

L'épithélium intestinal peut, par lui-même, détecter directement les bactéries et les agents pathogènes commensaux. Cette détection microbienne via les récepteurs de l'immunité innée PRR (pour Pattern recognition receptor) module l'homéostasie intestinale, puisqu'elle permet d'activer d'autres fonctions dans les CEI et les cellules hématopoïétiques (146-148). Les voies pro-inflammatoires pour alerter l'hôte de l'infection sont alors activées (149). Ils permettent donc d'établir et d'engendrer une réponse immunitaire adaptée et protectrice.

Il est important de noter que les ligands des PRRs ne sont pas exclusivement des éléments pathogènes. Ils peuvent, en effet, aussi être produits par la flore commensale durant la colonisation de l'intestin. L'activation des PRR et leur contexte d'activation est donc crucial.

#### **A - Physiologie**

En condition saine, l'activation basale du PRR permet le bon fonctionnement de la barrière intestinale et concourt à une bonne composition de la flore commensale.

Une bonne activation basale des PRR induit des signaux permettant le maintien d'un épithélium intestinal sain.

Deux classes différentes de PRR sont connues et impliquées. Les récepteurs Toll-like (TLR) généralement associés à des membranes cellulaires, vont reconnaître des domaines présentant des répétitions riches en leucine (LRR) et possèdent un domaine intracellulaire de type récepteur à l'interleukine-1 (IL-1R) (150).

Le domaine d'oligomérisation liant les nucléotides (Nod), Nod1 et Nod2, est présent dans le cytosol des cellules épithéliales et cellules immunitaires. Ces protéines ont également des LRR (Leucine-Rich Repeat) en C-terminal, un domaine Nod et des domaines CARD à l'extrémité N-terminale (151). Les TLR1 à TLR9, Nod1 et Nod2 sont exprimés par les cellules épithéliales intestinales (149, 152).

Il existe aujourd'hui, une riche littérature, prouvant et démontrant que la signalisation via Nod ou via les TLR, active le facteur de transcription NF-kB, aboutissant, ainsi, à une réponse inflammatoire et à l'expression de gènes pro-inflammatoires (150, 151).

### **B - Les récepteurs de type TOLL**

Les TLRs (Toll-like receptor) sont impliqués dans la défense contre les éléments pathogènes. Ils permettent également de réguler l'abondance des commensaux et maintiennent l'intégrité des tissus (91). On retrouve à la surface de l'épithélium intestinal une grande diversité cellulaire de TLRs (153). Cette diversité permet l'interaction entre ces récepteurs immunitaires et la flore commensale. Ce dialogue qui peut initialement paraître anodin ou dangereux, est essentiel pour la maturation, le bon développement, et le maintien de l'homéostasie du microbiote intestinal. Par exemple, le TLR5, est connu pour avoir une forte importance dans la maturation du microbiote intestinal (154-156).

L'hétérodimère TLR2/TLR1, associé à d'autres facteurs (Dectin-1), va quant à lui, reconnaître le polysaccharide A (PSA) produit par la bactérie *Bactéroides fragilis*.

Ce dernier est connu pour initier la symbiose et la mise en place du système immunitaire de l'hôte (157-159).

Lors de cette liaison, la voie de signalisation induite par la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) est activée. Une inhibition de la glycogène synthase kinase 3beta (GSK3beta) a alors lieu, induisant ainsi une liaison aux éléments de réponse à l'AMPC de la protéine CREB (protéines se fixant au CRE), qui induit alors la transcription de gènes anti-inflammatoires (160). En outre, la dectin-1 peut également réguler l'immunité intestinale en contrôlant la différenciation des cellules Treg et en modifiant la conformation du microbiote intestinal (161).

Les TLR reconnaissent une multitude de composés bactériens ou virologiques différents. Par exemple, le TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide de la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatif alors que le TLR5 reconnaît la flagelline bactérienne (149, 150). L'intestin arrive à effectuer une distinction entre les agents pathogènes et les bactéries commensales, et ce en cloisonnant les TLRs soit de manière basolatérale sur les cellules épithéliales, soit à l'intérieur des cellules épithéliales (162, 163).

L'importance des TLR dans la fonction de barrière de l'épithélium intestinal a été démontrée par différentes études.

Le modèle murin DSS-colite a notamment été utilisé (DSS : Dextran Sodium Sulfate). Il y est démontré que lors d'une administration de DSS, la couche d'IEC est détruite chimiquement. Les bactéries commensales peuvent ainsi pénétrer dans la lumière intestinale, conduisant alors au développement d'une colite aiguë, suivie d'une restauration et d'une réparation de la barrière épithéliale. De plus, il semble que les souris dépourvues de TLR spécifiques, comme Tlr2, Tlr4, Tlr5 ou Tlr9, ou déficientes en MyD88, présentent une susceptibilité accrue à développer une colite de type DSS, caractérisée par une réparation tissulaire défectueuse et/ou une mortalité accrue (146, 148).

Les TLR sont donc essentiels au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et donc à l'homéostasie intestinale. De par leurs signaux, ils induisent la libération de facteurs protecteurs intrinsèques dans les IEC, facteurs prolifératifs et anti-apoptotiques. Ils permettent la restitution de l'intégrité de la barrière épithéliale suite à un dommage et fortifient les jonctions serrées intercellulaires (146, 148). Enfin, ils limitent la colonisation et la translocation bactérienne en stimulant, notamment, la production d'AMP par les IEC (164). Ces différents exemples confirment bien la nécessité et l'importance d'un dialogue perpétuel entre la flore commensale intestinale et les structures immunitaires du tissu.

### **C - Les récepteurs de type NOD**

Les NLRs (*NOD-like Receptors*), également des récepteurs de l'immunité innée, peuvent, eux aussi, impacter la composition du microbiote intestinal. L'activation de ces récepteurs cytosoliques est importante dans le maintien de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.

Nod1 et Nod2 reconnaissent des motifs légèrement différents, des motifs muropeptidiques dérivés de peptidoglycane bactériens (Philipott DJ and Girardin SE, 2004). Ils sont donc très alertes vis-à-vis d'une infection bactérienne intracellulaire ou face à une tentative de passage des cellules épithéliales (165). NOD1 (*nucléotide-binding oligomerization domain-containing protein 1*), par exemple, agit comme un senseur inné. Il va permettre la génération de tissus lymphoïdes adaptatifs et la maintenance de l'homéostasie intestinale (55). Concernant le senseur NOD2, il prévient l'inflammation de l'intestin en limitant la croissance de la bactérie commensale *Bacteroides vulgatus* (166).

Lorsqu'il est stimulé par une bactérie commensale, la survie des cellules souches de l'épithélium intestinal est permise, entraînant ainsi le maintien et sa régénération (167).

Des études sur des souris déficientes en Nod1 ou Nod2, ou sur des souris portant un allèle mutant NOD2 associé à la maladie de Crohn humaine, ont mis à jour des défauts de sécrétion de la défensine ainsi qu'une sensibilité accrue à la colite suite à une administration de DSS (168, 169). NOD2 semble atténuer la signalisation des TLR, entraînant une activation excessive des cellules dendritiques et donc une stimulation augmentée des cellules TH1 (168).

### Les inflammasomes

Certains NLRs (*NOD-like receptor*) s'assemblent entre eux et avec d'autres protéines, afin de former des complexes multiprotéiques retrouvés dans différents types cellulaires, ce sont les inflammasomes. Ce complexe macromoléculaire se forme par oligomérisation d'un récepteur, d'un adaptateur et de la caspase-1. L'association de ces différents partenaires se fait via l'interaction entre domaines homotypiques. Les inflammasomes, sont des structures essentielles au déroulement de l'inflammation. C'est un complexe de l'immunité innée qui, en réponse à la détection de motifs microbiens ou de signaux de danger émis par certains PRR, va conduire à l'activation spécifique d'une caspase inflammatoire, la caspase-1.

Ces complexes multimoléculaires, formés suite à l'activation des NLR cytosoliques, vont s'associer à la caspase-1, et ce notamment via l'interaction à de protéines adaptatrices comme ASC22. La caspase-1, alors activée, possède un rôle essentiel dans l'élaboration de la réponse inflammatoire, en contrôlant, notamment, la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires clés, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18. Ces dernières vont ensuite se lier à des récepteurs spécifiques qui utiliseront Myd88 comme élément de réponse pour induire la transduction du signal inflammatoire et donc engendrer la réponse immunitaire appropriée (Schroder K and Tschopp J, 2010), ainsi qu'une mort cellulaire (170).

Par exemple, l'inflammasome NLRP3 est composé du récepteur NLRP3, de l'adaptateur ASC et de la procaspase-1. L'inflammasome NLRP3 résulte en une activation médiée par NLR, permettant de protéger l'épithélium après une lésion. Il semble que les souris déficientes en NLRP3 ou en caspase-1 développent une colite accrue après administration de DSS (171-173). De plus, chez les patients atteints de RCH, ce dernier est activé. Suite à cela, une production de ROS était observée sous l'action de la cytokine proinflammatoire IL1 $\beta$ .

L'inflammasome NLRP6, constitutif de la muqueuse intestinale, possède des NOD, LRR et un domaine de pyrine. Cet inflammasome agit directement sur la régulation de la composition du microbiote et sur la maintenance de l'homéostasie intestinale (174). Etant en interaction directe avec des produits issus du microbiote, il régule à la fois la sécrétion d'IL18 mais également les profils d'expression des AMPs (175). Il contrôle la sécrétion des cellules en gobelet (cellules sentinelles de l'intestin) permettant d'établir une protection continue contre les pathogènes et de réguler l'immunité innée intestinale (176, 177).

Les rôles potentiels de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 dans la survenue des MICI ont été confirmés et révélés notamment par l'identification du rôle central des inflammasomes et des NLR dans la survenue de ces maladies inflammatoires. Il se trouve que les niveaux d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 sont augmentés chez les souris présentant des MICI (12, 178). Les souris KO Il18 sont résistantes à la colite (induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique) (179), suggérant que l'IL-18 a un rôle dans la pathologie intestinale chronique. Cet axe inflammatoire médié par l'inflammasome est un axe important dans les réponses aux agents pathogènes intestinaux. La production d'IL-1 $\beta$  est médiée par l'ASC qui joue un rôle essentiel dans la pathologie intestinale induite par la toxine de *Clostridium difficile* (180). L'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 sont nécessaires pour l'induction des pathologies intestinales. Ainsi, les NLR formant des inflammasomes peuvent contribuer à la survenue et au développement de pathologies intestinales via ces deux cytokines.

Le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale est également permis par ce mutualisme entre la flore commensale et l'épithélium intestinal.

Par exemple, la reconnaissance des ligands aux TLR2 ou TLR9 par les cellules épithéliales va augmenter la fonction de barrière à l'épithélium intestinal (181, 182). La flore bactérienne commensale induit la production de protéines chaperonnes cytoprotectrices hsp25 et hsp72 dans les cellules épithéliales (183). Chez les souris déficientes en MyD88, molécule essentielle pour la voie de signalisation induite par les TLR, les chaperonnes ne sont pas exprimées (91).

L'ensemble de ces différents points nous permet d'établir le fait que par son impact sur la voie de signalisation des TLR, la flore bactérienne aide les cellules épithéliales de l'intestin à se protéger de dommages. Il a également été démontré que des micro-organismes non pathogènes retrouvés dans l'intestin pouvaient réguler l'inflammation (184).

De manière générale, la flore commensale semble effectuer une action/influence anti-inflammatoire, protégeant ainsi les cellules épithéliales des agressions.

#### **D - Autres récepteurs du système immunitaire inné**

Le bon développement des cellules immunitaires nécessite la reconnaissance de peptidoglycane ainsi que le recensement des bactéries intactes par le système immunitaire inné. Cette reconnaissance est notamment permise par de nombreux PRRs (185) :

- L'AIM2 (*Absent In Melanoma 2*) un autre PRR crucial, est nécessaire pour la bonne régulation de l'homéostasie intestinale et ce notamment via les voies de signalisation IL18/IL22/STAT3 (186).
- Les PGRPs (*Mammalian Peptidoglycan Recognition Proteins*) permettent de protéger l'hôte de la colite. Ils assurent le bon équilibre de la flore microbienne et empêchent la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK. Ces récepteurs de l'immunité innée agissent notamment en étroite collaboration avec NOD2.
- Enfin, IPAF, qui est également un membre de la famille NOD-LRR. Il reconnaît les composants bactériens anormalement présents dans le cytoplasme des cellules (le peptidoglycane (PGN) des bactéries GRAM positifs ou la flagelline bactérienne intracellulaire). Suite à cette reconnaissance, il active les inflammasomes, stimule la caspase 1 et promeut la production d'IL1 $\beta$  par le TLR5 et ce notamment dans les macrophages infectés par *Salmonella* (187).

#### **E - Conditions physio-pathologiques**

Lorsque les PRR sont hypersollicités et donc hyperactivés, l'homéostasie intestinale s'en trouve dégradée et la survenue de MICI est donc plus fréquente. Une hyperstimulation des PRR entraîne donc une inflammation intestinale.

L'organisme reste un compartiment cellulaire sujet à une éternelle balance qui doit être sans cesse maintenue pour éviter une altération de ses fonctions. C'est notamment le cas pour les PRR, puisqu'il a été démontré qu'une activation soutenue entraînait une inflammation intestinale chronique (146, 148).



Malgré le fait que les réponses inflammatoires soutenues induites par le PRR semblent exacerber la tumorigenèse intestinale, le rôle de ces PRR dans le maintien et la réparation de la barrière épithéliale et de protection contre le développement de tumeurs intestinales est également démontré (188).

Certaines études ont rapporté des effets protecteurs de ces PRR contre l'inflammation intestinale chronique. Le polysaccharide bactérien A, par exemple, semble être bénéfique pour l'intestin puisqu'il est capable de protéger les souris de la colite médiée par les lymphocytes T par l'induction de cellules Treg (117).

## **2 - Cytokines et homéostasie intestinale**

Une multitude de modèles animaux présentant des MICI spontanées ou induites expérimentalement et reproduisant les caractéristiques des MICI humaines, sont à disposition des scientifiques. Cependant, il n'existe pas de modèle expérimental parfait.

Les patients atteints de MICI présentent un spectre de caractéristiques pathologiques très divers, reflétant l'existence d'un large éventail d'effecteurs immunitaires, innés et adaptatifs. En effet, il semblerait qu'environ 100 loci génétiques distincts peuvent contribuer à la susceptibilité aux MICI. Or la cible clé de ces réponses immunitaires, le microbiote intestinal, est unique à chaque individu (189). Il est donc fortement probable qu'il existe plusieurs étiologies à ces MICI, et donc une multitude de réponses immunitaires distinctes induites par des effecteurs immunitaires différents.

Cependant, la littérature nous permet d'observer et de cibler des cytokines ou un groupe de cytokines jugées comme majoritairement responsable de ce dérèglement.

### **A - Facteur de nécrose tumorale alpha et Interleukine 6**

Certaines cellules immunitaires possèdent un rôle pro-inflammatoire dans la physiopathologie des MICI, c'est notamment le cas des cellules myéloïdes innées qui sécrètent les cytokines pro-inflammatoires de type TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*) et IL-6.

Le traitement par anticorps anti-TNF- $\alpha$  a été une avancée thérapeutique fondamentale et majeure dans le traitement de ces MICI (190). Les tests sur des modèles animaux de MICI a confirmé ce rôle du TNF- $\alpha$  dans l'inflammation intestinale chronique (12).

Cependant, malgré le succès des anti-TNF- $\alpha$  lors du traitement des MICI, un tiers des patients reste insensible à ce traitement, et chez de nombreux autres cas une perte de leur réactivité ou une intolérance à ces agents apparaît (190). Un traitement effectué avec des anti-TNF- $\alpha$ , semble induire une incidence accrue d'infections sévères et de tumeurs malignes chez les patients.

Il apparaît donc nécessaire de développer et d'explorer d'autres pistes thérapeutiques pouvant cibler l'inflammation intestinale de manière plus sélective (190).

L'IL-6, quant à elle, est augmentée dans la muqueuse intestinale enflammée. Il est donc logique que lorsque sa signalisation est bloquée, la colite présente dans les modèles murins est diminuée. De plus, cette inactivation s'est également révélée fructueuse et porteuse d'effets bénéfiques lors d'un essai clinique sur des patients atteints de la maladie de Crohn (12).

## **B - Réponses inflammatoires orientées :**

### Réponses Th1, Th17 et Interleukine 23

Les cellules T sont également des cellules pouvant produire de cytokines.

Il semblerait que les cellules T tueuses naturelles (NKT), productrices d'IL-13, jouent un rôle dans la survenue de la rectocolite hémorragique, et l'activation des cellules TH1 associée à la survenue maladie de Crohn (12).

Des souris knock-out pour le gène IL12b (également connu sous le nom d'IL-12p40) ou des souris recevant des anticorps neutralisant ce gène ou l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), présentaient une atténuation de la colite, soulignant donc un rôle majeur des cellules TH1 lors d'une inflammation intestinale (12).

Différentes études sur des modèles de MICI murin, ciblant une autre cytokine, l'IL-23, ont démontré son importance dans la pathologie intestinale chronique. L'IL-23 est induite suite à la stimulation de PRR et est exprimée de manière constitutive dans une petite population de cellules dendritiques présentes dans la lamina propria de l'iléon terminal. Les macrophages intestinaux CD14<sup>+</sup> de patients atteints de la maladie de Crohn, sécrètent également de grandes quantités d'IL- 23 (191).

L'IL-23 est un médiateur inflammatoire associé préférentiellement aux réponses de type TH17. Toutefois, elle permet également divers types de réponses pathologiques dans l'intestin. Elles peuvent être médiées soit par les cellules T, soit par une activation immunitaire innée excessive (192).

Les réponses immunitaires de type Th1 et TH17 utilisant l'IL23 sont cohérentes avec les niveaux d'IFN- $\gamma$ , d'IL-17 et d'IL-22 observés dans l'intestin enflammé (192).

Les facteurs de transcription contrôlant les réponses immunitaires de type TH1 ou TH17, comme T-bet ou le récepteur orphelin lié au récepteur d'acide rétinoïque- $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t), sont des acteurs essentiels dans le développement de l'inflammation causée par une colite médiée par les lymphocytes T (12, 193). La présence de cellules TH17 au niveau de la muqueuse épithéliale intestinale, ainsi que les niveaux accrus de cytokines TH17 dans l'intestin enflammé, ont mis en exergue leur rôle potentiel dans la pathogenèse des MICI (192).

Les cellules TH17 produisent plusieurs cytokines, dont IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22. L'IL-17A et de l'IL-17F sont connues pour avoir des effets pro-inflammatoires (le poumon et le cerveau). Ce processus pro-inflammatoire est sous contrôle de l'élaboration de cytokines et de chimiokines, favorisant le recrutement des neutrophiles (194). Il semble, cependant, que ces deux cytokines ne produisent pas les mêmes effets. Dans la colite aiguë induite par administration de DSS, l'IL-17A a un rôle protecteur, tandis que l'IL-17F semble exacerber la maladie (195).

La localisation des cellules TH17 est sous contrôle du microbiote intestinal. En effet, la colonisation de souris germ-free par des bactéries entraîne une forte présence de cellules TH17 dans la lamina propria intestinale (196, 197).

Une autre cytokine TH17 importante dans la réponse inflammatoire Th17 est l'IL-22. Elle permet de renforcer l'immunité innée des tissus. Son expression est limitée aux cellules non hématopoïétiques, que l'on retrouve notamment dans les cellules épithéliales de la peau, de l'intestin et des poumons (198). La production de cette cytokine entraîne la production d'AMP et favorise la régénération, la cicatrisation des cellules épithéliales par l'activation du facteur de transcription STAT3 (199).

L'administration d'IL-22, chez des souris atteintes de MICI, due à une administration de DSS, a atténué la gravité de la maladie en restaurant les cellules caliciformes et donc en permettant à nouveau une bonne production de mucus (198).

Malgré ses effets bénéfiques, il semble que son expression soit augmentée chez les patients atteints de la maladie de Crohn (198).

### **3 - Médiateurs du système adaptatifs et homéostasie intestinale**

L'intestin contient un vaste réseau de cellules impliquées dans la réponse immunitaire adaptative (200, 201).

Il est important de noter que l'interaction hôte-microbiote agit sur les fonctions du système immunitaire inné, mais également sur le système immunitaire adaptatif.

Dans les conditions homéostatiques, les cellules dendritiques et les macrophages vont favoriser la tolérance. Alors qu'au cours de l'infection, ces cellules immunitaires vont évoluer vers une nature plus inflammatoire, ce qui va induire une réponse de type pro-inflammatoire pouvant conduire à une pathologie immunitaire en cas de dérégulation.

#### **A - Cellules myéloïdes présentatrices d'antigène**

Il existe plusieurs types de populations de cellules présentatrices d'antigènes myéloïdes intestinales (CPA). Elles se distinguent les unes des autres par leurs phénotypes, leurs fonctions, leurs origines et leurs localisations anatomiques (200, 201).

Deux populations majeures de cellules dendritiques intestinales ont été identifiées sur la base de l'expression différentielle de la sous-unité d'intégrine CD103 et du récepteur de chimiokine CX3CR1. Les cellules dendritiques CD11chigh CD103+ sont issues de la même origine que les cellules dendritiques du tissu lymphoïde et sont dérivées de cellules pré-dendritiques sans passer par l'intermédiaire de monocytes (201, 202).

A contrario, les monocytes donnent, quant à eux, naissance aux cellules dendritiques intestinales CD11chigh CD103–CX3CR1+, mettant en évidence la relation étroite entre ces cellules et les macrophages intestinaux CX3CR1+.

On retrouve ces cellules dendritiques, CD103+, dans toute la lamina propria et dans les structures lymphoïdiques organisées.

Elles jouent le rôle de sentinelle au sein de l'intestin grêle et peuvent absorber des bactéries pathogènes et commensales, ainsi que des antigènes ou des IEC apoptotiques.

Ces cellules dendritiques CD103+ vont, après maturation, migrer vers le ganglion lymphatique mésentérique drainant (MLN), pour initier des réponses immunitaires intestinales adaptatives (202, 203).

L'ensemble de ces propriétés va dépendre de la production de métabolites alimentaires, de la vitamine et de l'acide rétinoïque. Ces derniers vont moduler de différentes manières les voies induites par l'activation des cellules dendritiques CD103+. Celles-ci induisent majoritairement et préférentiellement des voies de tolérance, notamment l'expression des cellules Treg FOXP3+ dans le MLN, par un mécanisme dépendant du TGF- $\beta$  et de l'acide rétinoïque (200). En outre, les propriétés des cellules dendritiques CD103+ ne sont pas fixes. Elles acquièrent de nouvelles propriétés inflammatoires au cours de l'inflammation intestinale, comme la capacité de produire de l'IL-6 et de générer des réponses TH1 (204). Ainsi, les cellules dendritiques CD103+ migratrices peuvent aussi bien favoriser les réponses tolérogènes des lymphocytes T que leurs réponses effectrices.

Les cellules présentatrices d'antigène, CX3CR1+CD103-, comprennent une population hétérogène de cellules dendritiques et de macrophages.

On retrouve les cellules dendritiques CD11c+CX3CR1+ proches de l'épithélium intestinal, mais elles peuvent aussi s'étendre à travers l'épithélium afin de prélever des antigènes et des bactéries. Elles ne semblent, cependant, pas migrer vers les MLN et ne parviennent pas à amorcer les cellules T naïves (200, 201). Cela laisserait à penser que leur rôle principal est de moduler localement les réponses intestinales adaptatives (203). Quant aux cellules CX3CR1+, elles vont s'accumuler suite à des signaux initiés par le microbiote intestinal (205).

Une récente étude a démontré que la kinase non canonique induisant le NF- $\kappa$ B (NIK) agissait comme un intermédiaire crucial à la bonne fonction des cellules dendritiques, retrouvées sur les muqueuses. Il semblerait que cette NIK, spécifique des CD, puisse agir que la sécrétion d'IgA intestinal et l'homéostasie du microbiote. De part cette action, elle rendrait les souris plus vulnérables au développement de maladies intestinales.

Les macrophages intestinaux vont, eux aussi, contribuer à l'homéostasie intestinale, et ce de plusieurs manières. Ce sont des cellules possédant des capacités phagocytaires : elles éliminent les cellules apoptotiques, les débris et peuvent ainsi concourir à la réparation des dommages retrouvés sur l'épithélium (206). Ils empêchent la survenue de réponses inflammatoires excessives envers la flore intestinale.

De par leur propriété, ces macrophages intestinaux empêchent l'expression d'inhibiteurs de la voie NF- $\kappa$ B, induisant une activité bactéricide en l'absence de cytokines pro-inflammatoires. Des études suggèrent que ces cellules favorisent également la tolérance, et ce notamment grâce à la production d'IL-10, ainsi qu'au maintien de FOXP3 dans les cellules Treg du côlon (207). Il a été démontré que dans les MICI et lors d'une colite expérimentale, le nombre de macrophages et de cellules dendritiques était largement augmenté, entraînant une production de cytokines pro-inflammatoires (201).

Certaines études sur des modèles murins présentant une colite aiguë et chronique, montrent une association marquée entre une réactivité des TLR et une augmentation de la proportion de cellules dendritiques dérivées des monocytes recrutés produisant de l'IL-12, de l'IL-23 et du TNF- $\alpha$  (208).

## **B - Populations de cellules T régulatrices**

Les cellules T peuvent avoir des fonctions anti-inflammatoires. Mais ce sont les cellules Treg FOXP3<sup>+</sup> et les cellules T CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> sécrétant l'IL-10 qui sont particulièrement importantes dans l'intestin.

L'expression de FOXP3 est acquise dans le thymus et explique donc pourquoi cette population de cellule T a un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie immunitaire. Il a été démontré que des mutations, de type délétion ou perte de fonction, sur le gène codant de FOXP3, entraînent une maladie inflammatoire mortelle chez la souris, et un dérèglement immunitaire s'accompagnant souvent d'une inflammation intestinale chez l'Homme. Les cellules Treg FOXP3<sup>+</sup> sont abondantes dans l'intestin grêle et le côlon, où elles contrôlent les réponses induites par des stimuli alimentaires et microbiens (209).

L'intestin est un site préférentiel dans l'activation et l'induction de certaines populations cellulaires. En effet, en plus, des cellules Treg dérivées du thymus, cet organe est le lieu de

prédilection de l'induction des cellules Treg FOXP3+ de manière dépendante du TGF- $\beta$ , à partir des précurseurs des cellules T CD4+ naïves (209).

Ces cellules permettent et aboutissent à des mécanismes de tolérance orale, mais peuvent également contrôler, de manière locale ou systémique, les hypersensibilités induites par l'antigène.

Il semble que le microbiote intestinal possède un rôle dans l'élaboration des réponses cellulaires intestinales de type Treg. Une relation et un dialogue entre le microbiote intestinal et les cellules régulatrices T CD4+ sont en effet observés.

L'accumulation de cellules Treg dans le côlon est réduite, voir quasi inexistante chez les souris germ-free. Elle peut cependant être augmentée suite à une exposition à certaines bactéries (210). Il semble que la régulation des populations cellulaires de type Treg et TH17 soient induites de manière réciproque. Les deux populations nécessitent la présence du TGF- $\beta$  pour leur différenciation, mais ce sont les signaux médiés par STAT3 (tels que l'IL-6 ou l'IL-23) qui vont favoriser la différenciation en cellules TH17 (192, 211).

On retrouve diverses populations de cellules TH17 fonctionnellement différentes dans l'intestin. Leurs propriétés inflammatoires sont largement déterminées par les bactéries initiatrices de leur différenciation. Par exemple, les cellules TH17 induites par *SFB* sont non inflammatoires, alors que les cellules TH17 induites par *Citrobacter* sont à l'origine d'une forte production de cytokines inflammatoires (212).

Il convient donc de dire que le microbiote intestinal est impliqué dans la différenciation des TH17 intestinales. Même si leur développement cellulaire reste indépendant de cette flore microbienne (213).

La balance entre les différentes populations de cellules T (Treg et T effectrice) permet à la réponse inflammatoire de limiter l'induction des cellules Treg, en présence de stimuli pro-inflammatoires, favorisant ainsi les réponses des cellules T effectrices intestinales et la défense de l'hôte. Cette balance et le bon équilibre trouvé entre la présence de cellules Treg et cellules T effectrices est un élément important permettant d'établir le contrôle de l'homéostasie intestinale. En effet, par leur capacité à survivre et à entrer en compétition avec les cellules T effectrices dans la niche intestinale, les cellules Treg jouent, ici, un rôle non-négligeable (211).

Une étude montre que les souris, KO pour Stat3 dans les cellules Treg FOXP3+, développent une colite agressive suite à des réponses TH17 incontrôlées (214). Lors de l'homéostasie intestinale, certains facteurs de transcription initiateurs de réponses effectrices spécifiques (Tbet, IRF4, GATA3) permettent le contrôle par les cellules Treg de certains effecteurs immunitaires.

Malgré cette belle coordination et coopération entre les différents types de population cellulaire, le système reste en équilibre, équilibre pouvant être branlant et conduisant à une instabilité des cellules Treg. Lorsqu'elles expriment fortement le facteur de transcription T-bet, et qu'une infection intestinale aiguë est présente, les cellules Treg vont alors s'orienter vers un phénotype inflammatoire sécréteur d'IFN- $\gamma$  (215).

Les lymphocytes T CD8+ (cytotoxiques) font partie de la famille des lymphocytes T. Ce sont des agents primordiaux dans l'élimination du pathogène intracellulaire et des cellules cancéreuses. Pour qu'elles soient activées, ces cellules requièrent un amorçage de l'antigène par des cellules présentatrices d'antigène (CPA), induisant ensuite une amplification de cette population cellulaire cytotoxique via la signalisation des cellules T CD4+ (216).

Les cellules folliculaires auxiliaires T (Tfh) sont, quant à elles, spécialisées dans l'aide aux cellules B. Ces cellules sont cruciales notamment lors de la formation du centre germinatif, de la maturation des anticorps, de la génération de réponses immunitaires affines et de cellules mémoires B (217).

Comme les autres populations cellulaires, les cellules Tfh sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie du microbiote intestinal (218, 219). La relation entre les cellules Tfh et le microbiote est réciproque. La différenciation des cellules Tfh est altérée chez les souris germ-free, mais elle est restaurée suite à l'administration d'agonistes du récepteur Toll-like 2 (TLR2), activant alors la signalisation intrinsèque de MyD88, et rétablissant une bonne réponse inflammatoire (220).



### C - Les immunosuppresseurs et cytokines immunorégulatrices

Le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*) est un modulateur de la réponse immunitaire et est fortement présent dans l'intestin (221). Le TGF- $\beta$  est produit sous la forme d'un précurseur inactif qui doit être modifié de manière post-traductionnelle pour, ensuite, devenir biologiquement actif. Il s'agit d'un processus étroitement contrôlé par les cellules dendritiques intestinales et les macrophages (200).

La production et la réactivité des cellules T face au TGF- $\beta$  est cruciale pour le maintien de l'homéostasie intestinale (221). Lorsque les lymphocytes T ne peuvent pas répondre aux stimuli induits par le TGF- $\beta$ , ils échappent au contrôle médié par les lymphocytes Treg.

Les lymphocytes T de patients atteints de MICI sont, quant à eux, insensibles aux actions anti-inflammatoires du TGF- $\beta$  (222). Une nouvelle piste thérapeutique pour le traitement des MICI pourrait, donc, être de restaurer la réactivité du TGF- $\beta$ .

De plus, en conditions physiologiques, les IEC subissent l'apoptose, cette dernière peut être à l'origine d'une source de TGF- $\beta$  favorisant une tolérance immunitaire. Enfin, les IgA peuvent, elles aussi, entraîner une stimulation TGF- $\beta$ -dépendante et donc induire le renforcement de l'homéostasie intestinale par les cellules Treg (223). Lorsque l'apoptose des IEC n'a plus lieu de manière physiologique, mais qu'elle est dérégulée et qu'elle accompagne l'infection et l'inflammation, une réponse inflammatoire de type Th17 peut être induite, puisqu'en présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TGF- $\beta$  la favorise (224).

L'IL-10 est une cytokine immunorégulatrice, produite par un large éventail de cellules comme les cellules T, les cellules B et les cellules myéloïdes

L'IL-10 contrôle l'inflammation intestinale chronique en partie grâce à des effets anti-inflammatoires directs sur les cellules myéloïdes, comme les macrophages intestinaux. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> produisent de l'IL-10 et peuvent par son biais prévenir l'inflammation intestinale. Dans l'intestin, nous retrouvons un grand nombre de cellules CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> ainsi que les deux populations FOXP3<sup>+</sup> et FOXP3<sup>-</sup>. A contrario, dans le côlon, il s'agit principalement de cellules FOXP3<sup>+</sup> (209).

Les bactéries intestinales, comme les *Clostridium* par exemple, favorisent l'activité des cellules Treg retrouvées dans le colon en induisant la production d'IL-10 (210).

Contrairement aux cellules exprimant FOXP3, les cellules FOXP3-IL-10+ CD4+ sont regroupées en population plus hétérogène. Les cellules Th1, Th2, Th17, sous-ensembles de cellules TH effectrices, sont connues pour produire de l'IL-10 après une stimulation immunitaire chronique (225).

La délétion de l'IL-10 chez la souris conduit au développement de la colite (209). L'importance de l'IL-10 et de son rôle dans le contrôle de l'homéostasie intestinale est mis en évidence par un large spectre d'études. De plus, il est suggéré que certaines bactéries intestinales peuvent induire de l'IL-10, facette importante du mutualisme hôte-commensal.

## **4 - Inflammation intestinale induite par la flore commensale : modèles animaux**

Il existe plus de 30 modèles murins de MICI.

L'ensemble de ces modèles sont classés en 4 groupes distincts : la colite se développant spontanément, la colite induite chimiquement, la colite se développant à partir de dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale, et la colite chez les souris présentant un système immunitaire génétiquement modifié ou des fonctions cellulaires perturbées (226). Pour la plupart de ces modèles murins, l'absence de bactéries commensales en condition germ-free entraîne une absence voire une réduction de la colite (87).

Des études montrent que les lignées cellulaires CD4 T vont réagir face aux bactéries pathogènes entériques et induire une colite.

Dans certains modèles expérimentaux, il a été montré que certaines espèces bactériennes pouvaient induire les MICI. Par exemple, chez le rat transgénique HLA-B27, *Bacteroides vulgatus* induit une colite, tandis qu'*Escherichia coli* ne provoque aucune lésion. Pour les souris délétées en l'IL-10, *E. coli* commensal induit une maladie. Ces modèles ont été extrêmement importants puisqu'ils ont permis de démontrer que les réponses immunitaires dirigées contre la flore bactérienne pouvaient provoquer une MICI, mais également perturber l'homéostasie intestinale et conduire à divers phénotypes inflammatoires (226).

### **La flore commensale comme antigénique**

#### Stimulation de l'inflammation intestinale

La relation entre le système immunitaire et la flore commensale est sans cesse en équilibre, à tel point que les perturbations de l'homéostasie intestinale immunitaire ou/et épithéliale, peuvent aboutir à une inflammation intestinale. La flore commensale, initialement bénéfique, peut alors agir comme un agent pathogène bactérien de substitution.

#### Interactions des commensaux avec le système immunitaire de la muqueuse.

Les individus sains possèdent un système immunitaire intestinal abondant et très actif. Ce système est très réglementé et contrôlé, pour éviter un dérèglement de la réponse immunitaire face aux aliments et aux bactéries intestinales (227, 228).

Une différence majeure entre le système immunitaire systémique et le système immunitaire muqueux est la localisation des sites inducteurs de l'immunité muqueuse dans le tissu lymphoïde, les Plaques de Peyer (PP), et des sites effecteurs présents dans la Lamina Propria (LP) et l'épithélium (228).

Lorsque les cellules T et B sont activées dans les PP, ils expriment l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et migrent vers la circulation sanguine (229). De par leur complémentarité Recepteur-Ligand, ces cellules vont s'acheminer vers l'intestin et vont s'ancrer sur des cellules endothéliales intestinales, permettant, ainsi, aux cellules dérivées des PP de migrer à travers les vaisseaux sanguins dans la LP. Le colon, comme les cellules épithéliales intestinales, va produire des chimiokines qui par chimiotactisme vont affiner et orienter la localisation de lymphocytes aux tissus (229).

La LP comprend une grande quantité d'anticorps producteurs de plasmocytes qui sécrètent entre 3 et 5 grammes d'IgA dans le lumière intestinale (228). On retrouve également des cellules T CD4, des macrophages, des DC, des mastocytes et des éosinophiles dans la LP (227, 228). L'épithélium intestinal contient, lui aussi des lymphocytes, on parle de lymphocytes intraépithéliaux (IEL), une population composée principalement de cellules T CD8 (230). L'exacte fonction des IEL n'est pas bien connue, certaines études montrent qu'ils pourraient cependant jouer un rôle dans la surveillance des tumeurs épithéliales, la protection contre les pathogènes épithéliaux, ou la promotion de la guérison de l'intestin après un dommage (230).

Il est, aujourd'hui, connu et admis par tous, que la présence d'un large système immunitaire intestinal est, notamment, sous la dépendance de la flore commensale. En effet, il a été démontré que les souris germ-free possèdent de petites plaques de Peyer et sans centre germinatif, peu de cellules plasmiques (IgA) et peu de cellules CD4 dans la LP, ainsi qu'un nombre réduit d'IEL. Par ailleurs, lorsque l'on introduit dans une souris germ-free, un microbe ou un ensemble bactérien, la flore est considérée comme suffisante pour restaurer le système immunitaire de la muqueuse intestinale.

Cette partie fait notamment un état de la littérature sur la pollution extérieure et son impact épidémiologique. Cet état de la littérature a été effectué dans une revue qui a fait l'objet d'une publication dans le journal, Science of total Environnement en 2021. Une traduction de cette dernière et un remaniement de sa structure a été effectuée pour qu'elle soit intégrée dans le manuscrit.

## 1 – Définitions et Généralités

Les effets de la mondialisation, l'industrialisation, l'urbanisation des nouvelles technologies et l'avènement de la modernisation sur la santé des individus soulève des problèmes de Santé Publique et inquiète les pouvoirs publics. Des problèmes de santé vont apparaître et augmenter en nombre, dans les prochaines années, en suivant et accompagnant l'augmentation de la pollution de l'air. C'est notamment le cas pour certaines maladies qui sont fortement retrouvées dans nos sociétés et qui sont devenues presque contemporaines et communes à notre mode de vie. Il y a de ça, quelques années, la pollution de l'air n'était pas considérée comme ayant un impact sur le développement et la survenue des maladies respiratoires et cardiovasculaires. Or, aujourd'hui, il est démontré que la pollution de l'air affecte notre organisme entier, induit des maladies et impacte également notre système gastro-intestinal en perturbant sa microflore intestinale (231) (figure 10).

Notre environnement aérien est pollué, on parle, donc, de pollution de l'air ou de la pollution atmosphérique. Un environnement est pollué quand il présente des éléments, en concentration et quantité variables, considérés comme pouvant altérer l'état naturel, physiologique, sain de la faune et la flore, ainsi que de la vie humaine. Cette pollution de l'air est en constante augmentation. Nous nous retrouvons, donc, confrontés à une croissance industrielle, une mondialisation, une surproduction, au brûlage des déchets municipaux, brûlage des résidus de récolte, à un nombre croissant de véhicules en circulation, à des réglementations environnementales et sanitaires inefficaces, etc. (World Health Organisation 2018b).

L'OMS, Organisation Mondiale de la Santé, de par son statut d'instance internationale, a produit différents rapports visant à alerter les populations, industrielles et individuelles, de l'impact de la pollution de l'air sur la Santé. Elle estime que la pollution de l'air ambiant est considérée comme le plus grand risque environnemental pour la Santé de notre siècle (OMS, 2020). Elle est reconnue comme étant cancérigène avéré pour l'Homme, par le CIRC, (Centre International de Recherche sur le Cancer) pour le cancer du poumon. Suite aux nombreuses études scientifiques relatant les impacts de cette pollution atmosphérique sur la santé humaine, l'OMS a déclaré qu'environ 91 % de la population mondiale vivait dans des endroits pollués, où la qualité de l'air ambiant dépassait les seuils sanitaires réglementaires (World Health Organisation 2018b). EN 2016, elle indique qu'environ 7 millions de personnes sont décédées prématurément à cause de la pollution de l'air (Organisation mondiale de la santé 2018b) et qu'aujourd'hui elle est responsable d'environ 8,8 millions de décès par an (232). De plus, un gradient géographique est établi pour la mortalité due à la pollution atmosphérique : en effet, cette dernière est dominée par l'Asie de l'Est (35 %) et l'Asie du Sud (32 %), suivies de l'Afrique (11 %) et de l'Europe (9 %) (233).

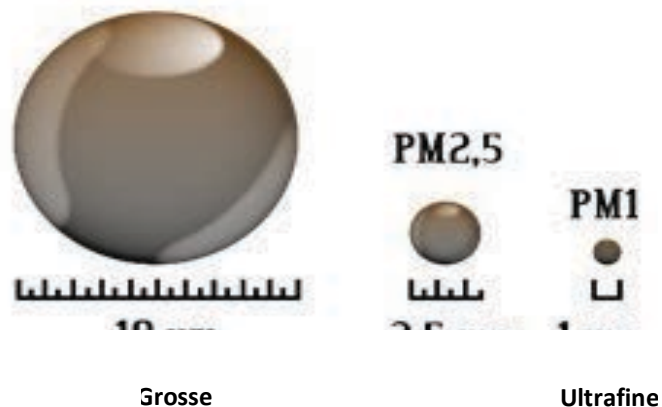
## **A - LA POLLUTION EXTERIEURE**

La pollution de l'air est définie comme étant la présence de substances nocives dans l'atmosphère pouvant résulter de causes naturelles (comme les éruptions volcaniques, les poussières de vent) mais également d'activités humaines (comme la combustion de carburants, l'industrie, la circulation, la cuisine, le tabac). C'est un mélange complexe de particules solides et liquides en suspension dans l'air et de composants gazeux, connus pour avoir des effets néfastes sur la Santé. Sa constitution est variée et présente des particules de l'air (Particulate Matter PM) des polluants gazeux comme le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>), l'ozone (O<sub>3</sub>) et des composés organiques volatils (COV). C'est parce qu'on retrouve dans notre air ces polluants, en grandes proportions, qu'il existe un danger pour les organismes exposés.

## a - Les particules de l'air (Particulate Matter PM)

- **Les particules de l'air (PM)**, concourent à la pollution atmosphérique et sont ses constituants les plus connus, étudiés et documentés par la communauté scientifique. Les PM sont principalement constituées par des particules solides dérivées de la combustion de l'essence, du charbon et des carburants diesel (234).

Une de leur particularités et spécificité est leur taille (235), qui permet de les définir et de les classer en différentes catégories (figure 9). Par exemple, on retrouve les PM<sub>10</sub> ou les grosses PM ayant un diamètre aérodynamique de 10µm, puis les PM<sub>2,5</sub> ayant un diamètre aérodynamique de 2,5 µm, et enfin les PM ultrafines (UFP) ayant un diamètre aérodynamique de 0,1 µm. Leur source permet également de les catégoriser. Les particules d'échappement diesel (DEP) par exemple, n'auront pas les mêmes caractéristiques et la même composition que les particules noires de carbone. Les PM sont majoritairement composées de pollen, de sulfates, de nitrates, d'un carbone organique, de poussières minérales, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), de métaux, d'ions et de composants biologiques (particules microbiennes, lipopolysaccharides et spores, par exemple) (236).



### **(PM : Particulate Matter)**

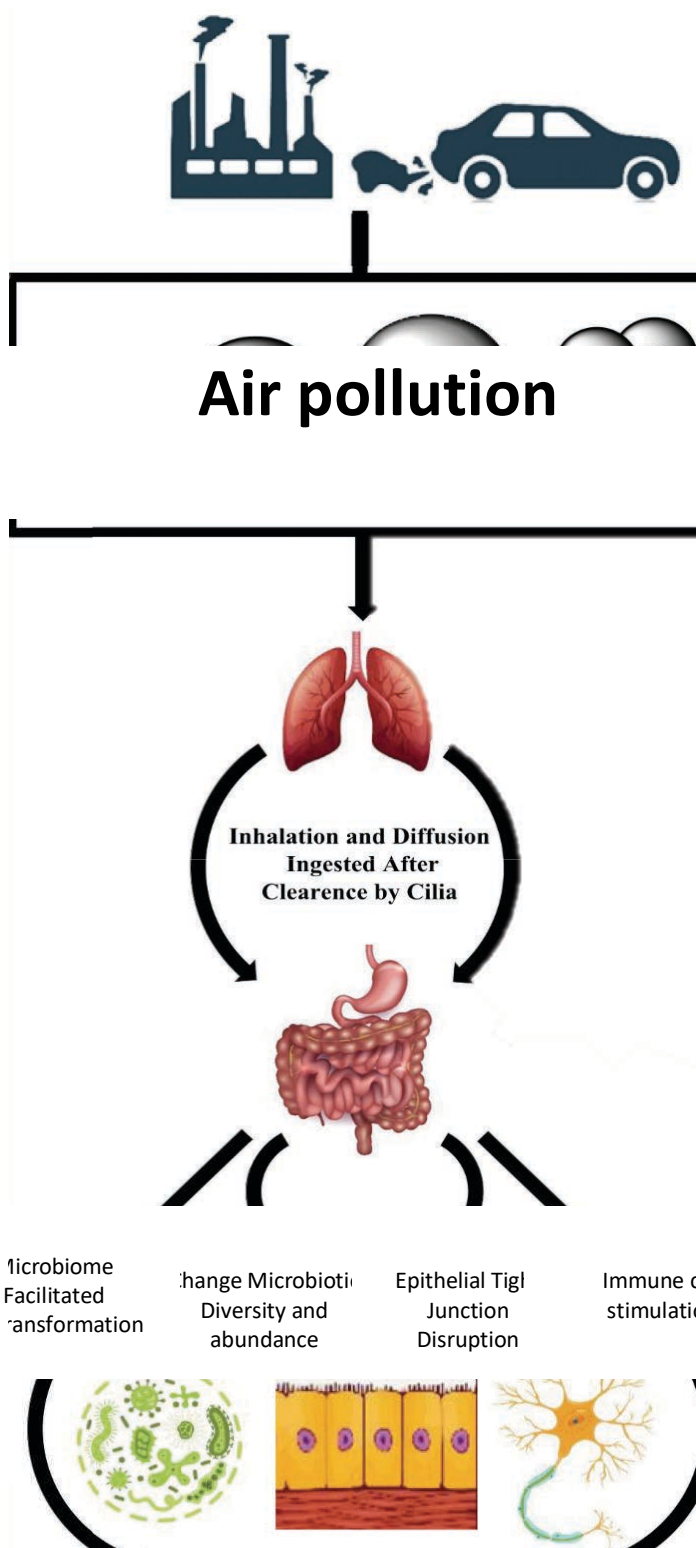
Les grosses particules sont les PM<sub>10</sub> de 10µm de diamètre, les particules fines sont les PM<sub>2,5</sub> de 2,5µm de diamètre et les ultrafines sont les PM<sub>1</sub> de 1µm de diamètre

## **b - Les composés gazeux**

- **Les polluants gazeux sont le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) et l'ozone (O<sub>3</sub>) et les composés organiques volatils (COV).** Il a été démontré que l'ozone induisait de l'inflammation et des dommages dans le tractus respiratoire, augmentant la perméabilité cellulaire et dégradant l'intégrité des jonctions serrées (237). Le dioxyde d'azote, a lui aussi, été démontré comme possédant des effets néfastes sur la santé (WHO Air quality guidelines for Europe, 2000).

La composition chimique des polluants dépendant de leurs sources de production. En 2015, Karaguliand and al, estime qu'environ 25 % de la pollution de l'air urbain était dus aux PM<sub>2,5</sub> issues du trafic routier, 15 % aux activités industrielles, 20 % à la combustion de produits domestiques, 22 % à des sources non spécifiées d'origine humaine et 18 % à des sources naturelles (238). Par conséquent, selon l'endroit où une personne réside, voyage et travaille, elle est exposée à un mélange unique de polluants.



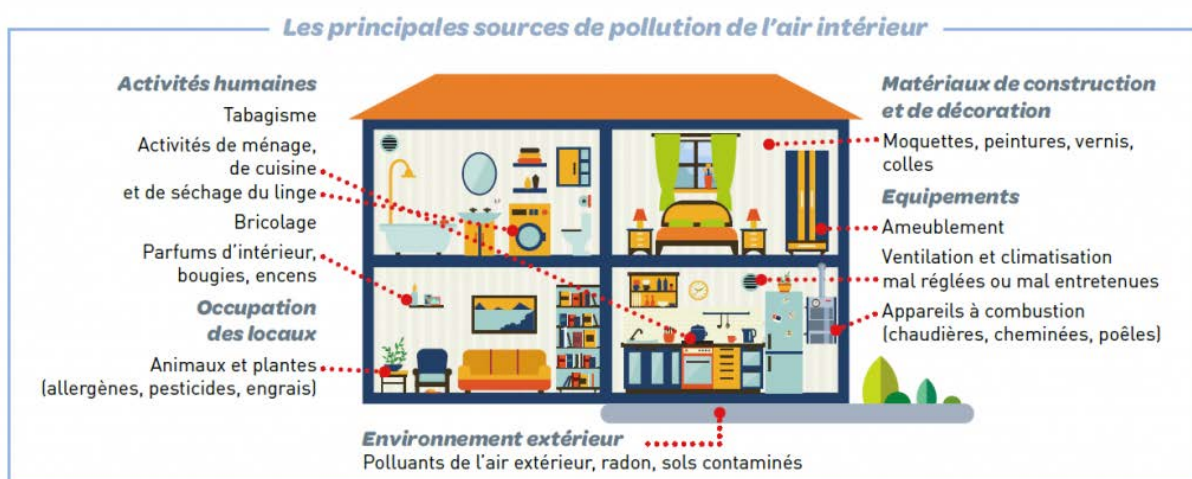


La figure montre des mécanismes hypothétiques reliant les polluants atmosphériques au microbiome intestinal. Les particules en suspension de l'air inhalées atteignent l'intestin après élimination mucociliaire muqueuses. Des biotransformations peuvent apparaître dans le micro-intestin, des changements dans la diversité bactérienne intestinale, des altérations de l'abondance relative des taxons bactériens intestinaux, la perturbation des jonctions serrées, et l'activation des cellules immunitaires.(2)



## **B - LA POLLUTION INTERIEURE**

La **pollution atmosphérique intérieure** est un mélange issu des polluants extérieurs et de contaminants provenant de l'intérieur du bâtiment. Les polluants extérieurs sont principalement issus de la circulation automobile et des activités industrielles et entrent par les infiltrations et/ou par les systèmes de ventilation naturelle et mécanique dans l'environnement intérieur (239). Il existe diverses sources de pollution intérieure : les matériaux de construction et les meubles (par exemple, les peintures et les produits de préservation du bois, les éléments d'ameublement, de décoration, les colles), les activités de combustion (par exemple, les cheminées, les bougies et la cigarette), les produits chimiques de nettoyage et de la cuisine, les animaux, les activités humaines (tabagisme, bureautique, maquillage,...) (239) (figure 11). Ces polluants peuvent également engendrer des effets néfastes sur la santé humaine comme de l'asthme, des allergies, des irritations des voies aériennes supérieures...



**Figure 11 : Les principales sources de pollution de l'air intérieur**

La production de la pollution atmosphérique de notre environnement intérieur peut provenir de l'environnement extérieur (par les ventilations), de nos équipements, des matériaux de construction et de décorations retrouvés dans les intérieurs, des activités humaines, de l'utilisation et l'occupation des locaux. source : Ministère des Solidarité et de la Santé

C'est pourquoi, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) établit des valeurs guide de qualité d'air intérieur (VGAI) en évaluant les effets sanitaires de ce polluant. Ces valeurs correspondent, pour un polluant spécifique, à des concentrations aériennes de ce dernier en dessous desquelles aucun effet sanitaire ou aucune nuisance ayant un impact sur la santé n'est attendu et prédit pour la population générale.

Elle repose principalement sur la description et l'analyse des effets sur la santé, liés au polluant via l'exposition à l'air : le profil toxicologique de la substance est dressé. Le choix de l'effet sur la santé que l'on considère comme point critique. La synthèse des valeurs guides et des valeurs toxicologiques de référence (VTR) disponibles dans la littérature sur le polluant.

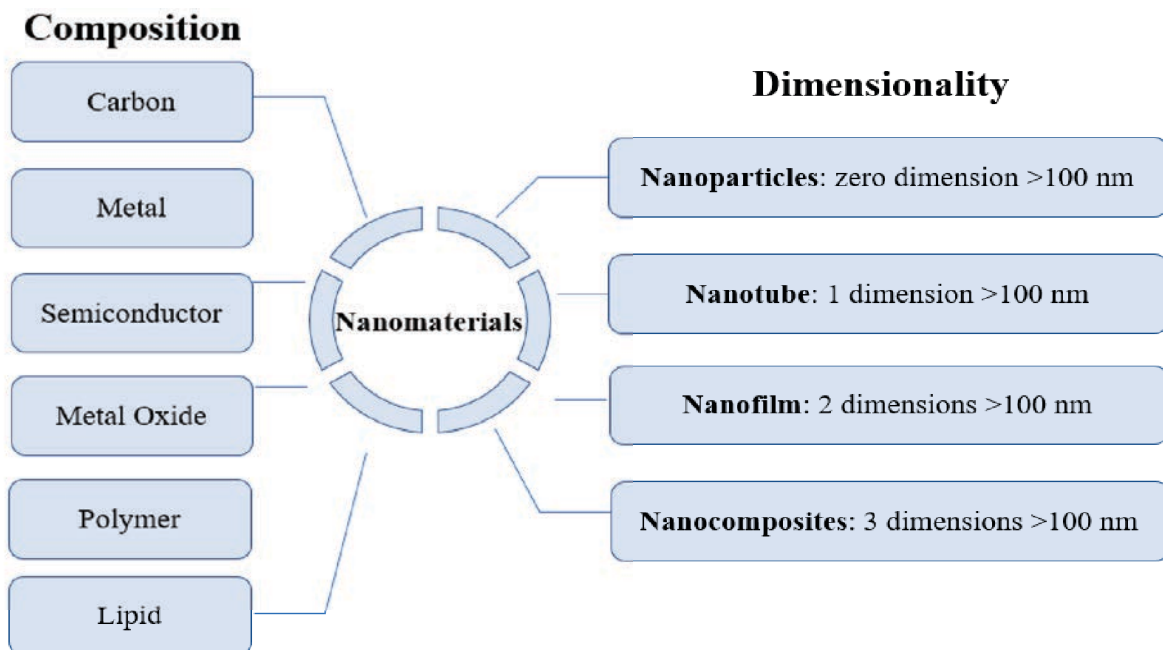
Ces valeurs sont de nature indicative et permettent au Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) de proposer des valeurs repères d'aide à la gestion de la qualité de l'air intérieur. Ces valeurs de référence sont importantes car elles permettent de définir et de cadrer les réglementations visant à protéger au mieux la population des effets induits lors d'une exposition par inhalation à cette pollution atmosphérique. L'objectif principal et final de l'établissement de ces valeurs de référence est de réduire, quand éliminer reste impossible, la concentration de ces polluants dans l'environnement des êtres humains à un niveau « acceptable » sur les risques ou potentiels effets adverses encourus pour la santé humaine. Aujourd'hui il existe des VGAI pour l'acétaldéhyde, l'acide cyanhydrique, l'acroléine, l'ammoniac, le benzène, le dioxyde d'azote, l'éthylbenzène, le formaldéhyde, le monoxyde de carbone, le naphthalène, les particules, le trichloroéthylène, le tétrachloroéthylène (2010) et le toluène (valeurs retrouvées dans la partie annexe). En outre il existe des valeurs repères pour le formaldéhyde, le benzène, le naphthalène, le trichloroéthylène, le tétrachloroéthylène et les particules.

Enfin, à la suite de l'établissement de ces valeurs, deux types de valeurs sont définis : i) une valeur guide pour l'air intérieur établissant un niveau de concentration de polluants dans l'air, à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai et pour un espace clos spécifique, ii) une valeur établie pour le cas spécifique des campagnes de mesures de polluants réalisées sur la qualité de l'air intérieur dans certains établissements recevant du public (ERP).

Un élément constitutif de l'ensemble de ces polluants intérieurs est les nanomatériaux, présentant des nanoparticules manufacturées. Ces derniers nous ont particulièrement intéressés et nous avons orienté nos recherches sur leurs effets suite à leur présence de plus en plus importante dans l'air intérieur des individus (4).

**a - Les nanoparticules**

A l'échelle du visible, il existe différents états de la nature, macroscopique, microscopique, nanoscopique, etc... L'ère de l'infiniment petit a mis en exergue l'échelle nanomoléculaire avec notamment l'apparition de nouveau terme relatif à ce niveau d'étude moléculaire, cellulaire, atomique. Les termes de nanoparticules, nanomatériaux, nanotechnologies sont notamment apparus au cours des années 90. Ils définissent des matériaux composés d'élément de taille inférieure à 100nm ( $10^{-9}m$ ), pour au moins une de leur dimension, pour les nanomatériaux, et des particules ayant au moins une de leur dimension inférieure à 100nm, pour les nanoparticules qui peuvent exister sous différentes formes : amorphe ou cristalline (figure 12). Elles peuvent être suspendues dans un gaz (aérosol), retrouvées au sein d'un liquide (colloïdal), sous forme de poudre ou dans une matrice (nano composantes de nanomatériaux). Elles possèdent une forte réactivité de surface et un nombre de particules par unité de masse élevé, dû à leur petite taille. Cette réactivité de surface est d'autant plus élevée que leur taille est petite. Les nanoparticules confèrent des propriétés physico-chimiques bien spécifiques aux nanomatériaux qu'elles constituent, et peuvent affecter leur réactivité, leurs propriétés optiques, électriques et magnétiques (240).



## **1/ Origines : naturelles et manufacturées**

Nous retrouvons naturellement des nanoparticules dans notre environnement. car elles peuvent être le produit de nombreux processus naturels comme les réactions photochimiques, les éruptions volcaniques, les feux de forêt, l'érosion, la perte de bout de peau, de poils par les animaux, les plantes, etc (240).

Les nanoparticules manufacturées (Engineered nanoparticle : EN) sont des particules produites par des processus humains comme la combustion ou/et la vaporisation, et qui leurs confèrent des propriétés très spécifiques (taille, forme, propriété de surface et propriétés physico-chimiques). Ces différentes propriétés ont déclenché un réel intérêt pour leur développement commercial, leur production et leur synthèse (241) (242). Elles ont été, très rapidement et massivement, utilisées pour la production de produits de soins personnels (les cosmétiques, les vêtements), de produits ménagers, et pour de multiples applications en électronique, aéronautique, dans l'industrie agroalimentaire, etc (4, 242). Le développement et l'apparition de ce type de nanoparticules a été bénéfique à l'industrie pharmaceutique, médicale, agrochimique, alimentaire, électronique, au secteur de l'énergie, apportant ainsi de nouvelles opportunités et défis pour ces différents domaines et disciplines (4) (243) .

## **2/ Exposition humaine**

L'utilisation des nano particules manufacturées dans l'industrie mondiale croit exponentiellement depuis maintenant plusieurs décennies : plus de 400 000 tonnes de nanomatériaux sont accessible sur le marché chaque année en France. Or, comme lors de l'apparition de toute innovation et toute forme de nouvelle technologie, leur utilisation et leur recours font également apparaitre le potentiel danger d'exposition pour l'Homme.

La possible exposition humaine apparait à différents moments du processus d'élaboration des nanomatériaux manufacturés. Le processus de génération des nanoparticules en phase gazeuse, cette production de nanomatériaux comme poudre ou solution, pose le problème du risque d'exposition et du relargage des nanoparticules (244). Le risque d'exposition à ces nanoparticules manufacturées augmente fortement pour les professionnels exposés puisque différentes possibilités d'exposition existent.

### **3/ Voie d'exposition : orale, cutanée, respiratoire**

Malheureusement, la population professionnelle n'est pas la seule à être exposée à ces nanoparticules, la population générale peut également y être exposée. Elles peuvent pénétrer dans l'organisme par le tractus respiratoire (exposition par voie respiratoire), par la peau (exposition par voie cutanée), par le tractus intestinal (exposition par voie orale), de manière intentionnelle ou non-intentionnelle (245).

L'inhalation est la voie d'exposition la plus commune pour les professionnels exposés aux nanoparticules, il en est de même pour la population générale.

Une fois inhalées, ces EN sont prises en charge par des forces électrostatiques dans le tractus respiratoire supérieur et inférieur (241). Elles se déposent le long du tractus respiratoire et peuvent rejoindre, transloquer dans la circulation sanguine. Elles peuvent atteindre d'autres organes par le système lymphatique en contournant les barrières (244, 246). Leur déposition dans le tractus respiratoire va dépendre de leur taille : les nanoparticules se déposent mieux et plus profondément dans les poumons que les plus grosses particules (240, 244, 245) (IRCP 1994 ; NIOSH 2006). Elles s'adsorbent ensuite aux cellules, transloquent plus profondément et entrent en contact avec la circulation sanguine, ou elles sont éliminées par la clairance mucociliaire et entrent en contact avec le tractus gastro-intestinal.

Une exposition à des particules ultrafines ambiantes (de tailles similaires aux EN mais issues d'un processus naturel de production) a un impact délétère sur le tractus gastro-intestinal de rongeur (247, 248). Ciblant spécifiquement les EN, des études observent une certaine toxicité d'organes suite à une exposition par inhalation (249-251). En outre, l'exposition à certaines nanoparticules manufacturées affectent la santé humaine (240). Malgré le fait que l'internalisation des nanoparticules soit généralement bien tolérée par l'organisme, lorsque ces dernières sont en quantité trop importante ou que leurs concentrations sont trop élevées, une altération des mécanismes de défense apparaît et entraîne une défaillance du système immunitaire se caractérisant par l'apparition d'effets toxiques. Les nanoparticules peuvent pénétrer dans l'organisme sous forme classique, en agglomérats ou/et en agrégats (244), et traversent ensuite les cellules, interagissent avec le tissu et causent ou provoquent des dysfonctionnements au sein de l'organe cible (244, 252, 253).

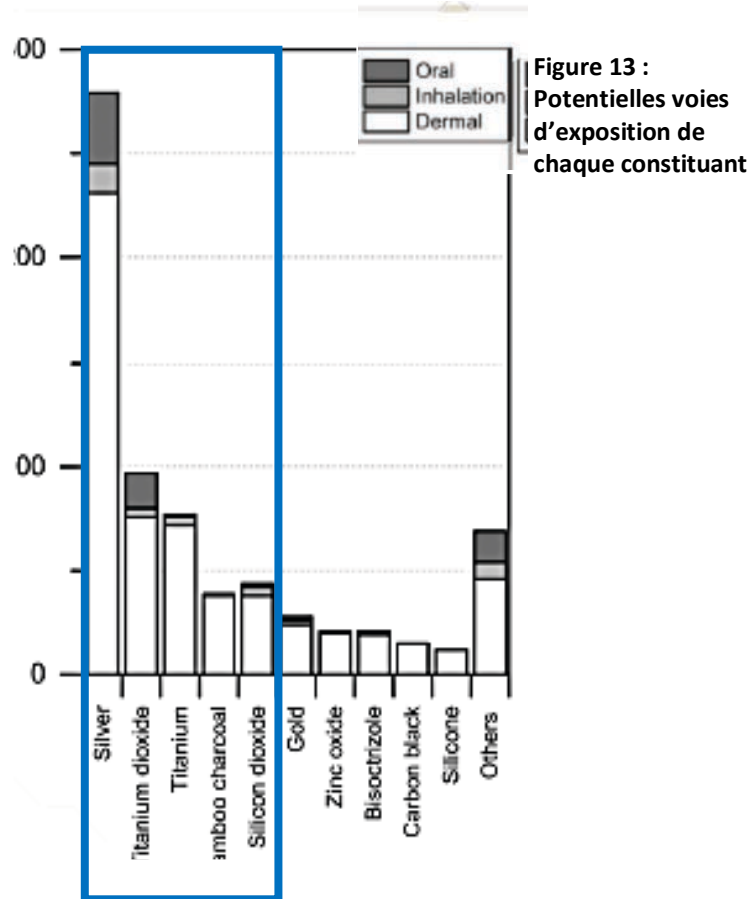
L'exposition à certaines nanoparticules induit une toxicité cellulaire avec une libération de ROS (Reactive Oxygen Species) et donc une production de stress oxydatif, causant une fragmentation de l'ADN, une oxydation lipidique, le dysfonctionnement des protéines, de la mitochondrie, une inflammation, etc. Certaines nanoparticules altèrent le mécanisme de clairance des macrophages, ainsi que leur fonction et leur activation, entraînant une augmentation de la perméabilité des jonctions cellulaires permettant la translocation de ces nanoparticules dans les organes. Elles affectent la capacité du système immunitaire à se défendre, contribuant au développement de maladies comme l'asthme, la pneumonie, le cancer du poumon, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Crohn, etc (254).

#### **4/ Exposition en cocktail**

La question de l'exposition se pose donc avec grand intérêt pour l'élaboration de normes et de règles sanitaires, pour les professionnels exposés, mais également pour la population générale. La voie d'exposition est à définir, est-elle respiratoire, cutanée, orale ? La nature des nanoparticules, la dose ainsi que la durée d'exposition à ces nanoparticules sont également à déterminer : quelles sont-elles ? Dose forte, moyenne ou faible ? Exposition aiguë, chronique, sub-chronique, sub-aiguë ?

Un individu est exposé à un ensemble, un cocktail de nanoparticules et non pas une seule nanoparticule. Elles sont de quantité variable et constitue des mélanges bien spécifique. Les principales nanoparticules manufacturées retrouvées dans notre environnement quotidien, et auxquelles la population générale est la plus exposée par inhalation, sont l'argent (Ag), suivi du titane (Ti), du dioxyde de titane ( $TiO_2$ ) et du dioxyde de silicium ( $SiO_2$ ) (4) (figure 13). Ces quatre nanoparticules ont été identifiées suite à la création d'une nouvelle base de données : The Nanodatabase (<http://www.nanodb.dk>). Cet inventaire en ligne se base sur le recensement par les fabricants des produits contenant des nanomatériaux ou basés sur la nanotechnologie. Une analyse des différentes bases de données européennes cataloguant les principales nanoparticules constitutives des nanomatériaux identifiés comme étant présents sur le marché européen a été effectuée. Après classification en fonction des différents types de matériaux et de leurs champs d'utilisation, les quatre EN citées se sont révélées être celles que les individus ont le plus de risque d'inhalation.





**Le Dioxyde de Titane : TiO<sub>2</sub> et le Titane : Ti**

Les nanoparticules de dioxyde de titane, TiO<sub>2</sub>, sont les nanoparticules les plus fréquemment utilisées. Leurs tailles ainsi que leurs formes vont dépendre de leur utilisation. Elles peuvent être de différents types : rutile, anatase, brookite (255). La forme anatase est la forme la plus communément retrouvée et présente le plus de toxicité (256).

Le TiO<sub>2</sub> est utilisé dans l'industrie agroalimentaire, dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, médicale ou pour la protection de l'environnement. On le retrouve lors du traitement de l'eau et pour la combustion des gaz, comme matériel antibactérien ou comme catalyseur lors d'une synthèse organique (255). Le dioxyde de titane est présent dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques, les blanchisseurs, les colorants alimentaires, le dentifrice, ainsi que les écrans solaires (257). Elles sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire lors de la production de pesticides et autres produits phytosanitaires pouvant ainsi affecter la fertilité des sols, la croissance des végétaux, etc. L'industrie alimentaire les utilise fréquemment comme additif (E171) dans les fromages, sauces, lait, crèmes glacées, chewing-gums, sucreries.

Malgré ce large panel et éventail d'utilisation et de propriétés chimiques avantageuses, le dioxyde de titane est classé dans le groupe 2B cancérigène par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) comme « *peut-être* cancérigène pour l'Homme ». Différentes voies d'expositions à ces nanoparticules sont possibles : l'exposition orale, subcutannée, dermale, en intraveineuse mais également par voie respiratoire. Elle est la plus retrouvée dans le milieu professionnel. Divers effets ont été observés après une exposition par inhalation : cancer du tractus respiratoire chez le rongeur suite à une exposition par inhalation, altération du cycle cellulaire et apoptose chez l'humain, dommage à l'ADN, accumulation de ces nanoparticules dans le foie, les poumons, le tractus digestif, le cœur, les reins, la rate, etc.

Le titane (Ti), quant à lui, est un métal qui a été découvert en 1790, premièrement utilisé comme un additif de peinture pour obtenir une couleur blanche. Le titane et ses alliages ont été très utilisés dans l'industrie ainsi que dans le domaine biomédical, pour la fusion, la fixation osseuse et la chirurgie de remplacement articulaire (arthroplastie). Le titane possède des propriétés mécaniques et chimiques spécifiques, sa résistance à la corrosion et sa bonne biocompatibilité font qu'il est utilisé depuis des décennies comme implants artificiels en chirurgie dentaire et orthopédique (258). On le retrouve aussi dans les produits de soins personnels comprenant les produits de beauté, les vêtements, les accessoires de fitness, les crèmes solaires, les produits de ménagers, etc (4).

### ***L'argent : Ag***

Les nanoparticules d'argent, Ag, sont issues d'un métal qui possède la plus haute conductivité électrique des métaux. L'argent est inactif chimiquement, stable dans l'eau et ne s'oxyde pas à l'air libre (259). Environ 320 tonnes de nanoparticules d'argent sont produites chaque année et utilisées dans le domaine de l'imagerie médicale, l'analyse par biosenseur et l'industrie alimentaire et pour de nombreuses applications commerciales (259). Elles sont connues pour leurs propriétés biologiques et biomédicales, antimicrobiennes, optiques, électriques et catalytiques (260). Elles sont souvent présentes dans des produits de consommation tels que les cosmétiques, les additifs alimentaires, les ustensiles de cuisine et les jouets. Leur propriété antimicrobienne explique pourquoi elles sont utilisées dans les domaines de la conservation des aliments, des produits de soins personnels (shampoings, lotions et dentifrices), des désinfectants, des textiles antibactériens, de la nanomédecine et de la dentisterie (259, 261-263).

Les principales voies d'exposition aux nanoparticules d'argent sont l'ingestion, l'inhalation, le contact dermique et l'introduction directe dans la circulation sanguine par injection (intrapéritonéal ou intraveineuse). Après une exposition à ces NP d'argent, elles sont capables d'induire une inflammation et un stress oxydant au niveau des sites d'exposition. Cette capacité intrinsèque de cytotoxicité est utilisée notamment à des fins médicales dans la lutte contre différents cancers comme le carcinome hépatocellulaire, le cancer du poumon et le cancer du sein. Elles peuvent également franchir les différentes barrières biologiques et atteindre la circulation systémique, le cerveau. Elles peuvent induire la production de ROS (264). La toxicité induite dépend des propriétés physico-chimiques des nanoparticules, des conditions environnementales ainsi que des interactions avec l'environnement (264, 265). La plus petite taille des nanoparticules d'argent possède une plus grande capacité à induire une hémolyse ainsi que des dommages membranaires (264).

#### ***Le dioxyde de silicium/silice : SiO<sub>2</sub>, SAS***

Le dioxyde de silice, SiO<sub>2</sub>, est produit en grande quantité et appliqué dans de nombreux produits de consommation et alimentaires. Les nanoparticules de SiO<sub>2</sub> sont utilisées comme additif alimentaire (E551) pour éviter les mauvais écoulements ou l'agglomération en particulier dans les produits en poudre. Elle est utilisée pour fournir des revêtements protecteurs et pour le traitement de l'environnement (pour protéger les produits contre les dommages environnementaux ou pour traiter l'air et l'eau dans la maison). La population générale y est donc fortement exposée. Ces nanoparticules sont internalisées par les cellules et induisent une cytotoxicité cellulaire en relarguant des ROS et des cytokines proinflammatoires, causant des dommages à l'ADN et membranaires (266).

En outre, une exposition par voie intratrachéale à différentes doses de SiO<sub>2</sub>, induit des modifications de composition du BAL (lavage bronchoalvéolaire) à la plus forte dose utilisée, avec une augmentation marquée de la population de neutrophiles (249).

La distribution systémique de ces nanoparticules de silice suite à une exposition par instillation intranasale répétée pendant 30 jours entraîne une augmentation des marqueurs inflammatoires (niveaux de peroxyde d'hydrogène, formation de MDA, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, et NF- $\kappa$  $\beta$ ) dans le cortex frontal, le corps strié, et l'hippocampe du cerveau, démontrant ainsi le pouvoir de translocation des nanoparticules de silice du nez vers le cerveau.

Les fonctions de reproductions murines sont également altérées suite à une exposition par voie intratrachéale (267). Une instillation intratrachéale répétée entraîne l'activation des médiateurs inflammatoires (macrophages), ainsi qu'une inflammation systémique dans les poumons, le foie et la rate (268).

La fabrication, le lavage ou l'élimination des produits manufacturés font que nous retrouvons ces nanoparticules dans notre air ambiant. Après avoir été inhalées, les nanoparticules ne se déposent pas et ne se transfèrent pas de la même manière dans l'organisme. Cela est notamment dû et influencé par différents facteurs comme le débit, la structure des voies respiratoires, les fonctions pulmonaires, l'âge et bien-sûr par la taille de la nanoparticule. Les plus petites particules vont se déposer plus profondément dans les régions alvéolaires et ce notamment par diffusion (269). La clairance mucociliaire ayant lieu, mais tardivement, les impacts dans les tractus respiratoires sont donc plus prédominants que lors d'une exposition à de plus grosses particules. La translocation dans les capillaires sanguins est très simple pour ces petites particules, qui peuvent présenter des dommages sur leurs couches épithéliales suite à la pénétration de ces nanoparticules (270).

## 2 – Les effets de la pollution de l'air sur la Santé Intestinale

De nombreuses études ont montré qu'une exposition aux polluants atmosphériques accentue ou entraîne le développement de nombreuses pathologies cardio-vasculaires (271, 272), pulmonaires (19, 273), neurologiques (274, 275), mais également de l'asthme, l'appendicite, la polyarthrite rhumatoïde (98, 99). Une exposition à la pollution de l'air entraîne une augmentation des cytokines inflammatoires circulantes, comme le facteur de nécrose tumorale alpha, et le nombre de leucocytes (276, 277). La surmortalité, due à la pollution de l'air et retrouvée à l'échelle mondiale, et est majoritairement expliquée par la survenue de maladies **pulmonaires** et **cardiovasculaires** (infections des voies respiratoires inférieures, maladies pulmonaires obstructives chroniques, cancers du poumon, maladies cérébrovasculaires et cardiopathies ischémiques) (232). D'autres travaux montrent un lien de corrélation entre des expositions à long terme à la pollution atmosphérique et la mortalité mondiale (278) (279) : un fort risque de développer des maladies cardiovasculaires et des maladies pulmonaires (avec un risque particulier pour le cancer du poumon) suite à une exposition aux particules fines existe (280).

Les poumons sont les premiers organes à être exposés à la pollution de l'air, suite à son inhalation. La taille des particules joue alors beaucoup sur leur devenir : celles de grosses tailles vont être retenues dans le tractus respiratoires alors que les plus petites peuvent atteindre l'espace alvéolaire, être phagocytées par les macrophages alvéolaires, et ensuite transportées vers l'oropharynx, dans la circulation systémique puis dans le TGI (281). Les particules ultrafines peuvent, elles-aussi, se déplacer et rejoindre la membrane alvéolaire dans la circulation systémique et être déposées dans d'autres parties du corps et générant des effets pro-inflammatoires locaux (282).

Aujourd'hui, la communauté scientifique démontre qu'une exposition à cette pollution atmosphérique entraîne une inflammation des voies aériennes supérieures (283, 284), qu'elle module l'inflammation et la pathogenèse de maladies associées à des organes éloignés du site d'exposition, comme les maladies métaboliques de type diabète (285).

Les effets pro-inflammatoires des particules inhalées, comme la production de cytokines par les poumons, peut s'exercer sur l'organisme entier. En effet, les nanoparticules peuvent rejoindre la circulation systémique et induire l'augmentation des médiateurs sériques comme IL-6, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, l'augmentation du nombre de neutrophiles et de plaquettes ; ainsi qu'entraîner des dysfonctions endothéliales et des vasoconstrictions artérielles (277, 286).

La survenue de crises et poussées inflammatoires pour des maladies comme la sclérose en plaques (pathogénèse similaire à celle des MICI) semble être associée à un appauvrissement de la qualité de l'air : les risques de rechute étaient quatre fois plus élevés lors des mois présentant le quartile de particules en suspension dans l'air le plus élevé. Une altération de la qualité de l'air entraîne une forte susceptibilité de développer des infections transmissibles, augmente l'inflammation initialement présente, induisant, ainsi, des phases de poussées inflammatoires plus aiguës (287). La survenue de crises inflammatoires au de MICI pourrait y trouver son origine et expliquer l'augmentation des hospitalisations en période de pic de pollution atmosphérique (16, 17). Une exposition à la pollution de l'air est impliquée dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et donc associée aux développements de troubles gastro-intestinaux (17). Cependant aujourd'hui, il existe beaucoup d'études ayant démontré et étudié l'impact d'une exposition orale (par gavage, ou distribution dans l'eau de boisson) aux polluants atmosphériques sur le TGI, mais peu ont étudié les effets de ces polluants lors d'une exposition similaire à une exposition humaine, c'est-à-dire par inhalation.

## **A - EFFETS DE LA POLLUTION DE L'AIR SUR LA SANTE INTESTINALE**

La société moderne sait qu'une exposition à la pollution de l'air n'est pas sans risques et possède des risques sanitaires pour l'Homme. Actuellement diverses études démontrent que les polluants atmosphériques induisent un effet immunomodulateur/inflammatoire systémique de l'organisme. De nombreuses maladies auto-immunes seraient donc liées à la vie urbaine et à l'industrialisation. Certains composants de cette pollution, comme les particules et l'ozone, sont désormais considérés comme pouvant altérer de manière importante la santé humaine (288). En effet, plusieurs études épidémiologiques démontrent que l'exposition aux étables et à l'agriculture chez le jeune enfant peut prévenir le développement de maladies atopiques. Cet effet est d'autant plus marqué que cette exposition se produit pendant la grossesse. A ce jour, peu de recherches étudient directement le lien causal pouvant exister entre une exposition à de la pollution de l'air et les maladies auto-immunes (289). De plus, la plupart des données sur les mécanismes possiblement induit proviennent majoritairement de travaux effectués sur l'impact de la pollution sur le système respiratoire et cardiovasculaire.

Le tractus gastro-intestinal est soumis à une exposition environnementale constante. Bien que plusieurs facteurs de risques environnementaux aient été étudiés à ce jour, tels que le statut socio-économique et l'alimentation, aucuns n'expliquent complètement et entièrement les déterminants des MICI. Il a été démontré et admis par les scientifiques que des polluants, comme l'ozone et les particules augmentent la perméabilité intestinale, et peuvent détruire les jonctions serrées présentes au sein des parois cellulaires intestinales (237, 281).

### **a - effets des PMs**

Lors de l'inhalation d'un composé volatile, pathogène ou non, nos voies respiratoires sont les premières à y être exposées. Une ligne de défense est établie et permet d'effectuer une séquestration dans les éléments non admis et considérés comme néfastes. Malgré cet arbre pulmonaire parfaitement structuré, certains éléments peuvent pénétrer et passer ces lignes de défenses. C'est le cas des PMs, nanoparticules, gaz ou autres éléments de taille variable pouvant traverser les mailles de l'arbre respiratoire.

Parmi les polluants atmosphériques, les PM, sont capables d'atteindre la circulation systémique, puis l'intestin et exercer des dommages sur la muqueuse intestinale. Les poumons vont, par la couche de mucus protectrice des voies aériennes inférieures, piéger les particules de l'air pour les éliminer. Elles sont ensuite absorbées par les macrophages alvéolaires, et grâce à la clairance mucociliaire, transportées dans l'oropharynx. Une déglutition peut avoir lieu et les particules sont avalées et atteignent l'intestin. Cependant, cette clairance mucociliaire, véritable outil de nettoyage des voies aériennes, n'est efficace et possible que pour les particules de taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$ , les plus grosses particules, sont quant à elles, séquestrées plus rapidement par le poumon (290).

L'intestin peut être exposé de différentes manières à ces particules de l'air : de manière directe lors de l'ingestion d'aliments et d'eaux contaminés (une personne peut ingérer jusqu'à  $10^{12}$ - $10^{14}$  particules quotidiennement (291, 292), ou de manière indirecte par inhalation. Les grosses particules vont atteindre le système digestif majoritairement par ingestion. Arrivés dans le système digestif, les métaux de transition des particules, environ 40 % à 60 % de leur composition, sont absorbés à travers l'épithélium intestinal et entraînent des réactions inflammatoires ou de stress oxydant membranaire (293).

La métabolisation par le microbiote intestinal des PMs entraîne la libération des toxines adsorbées (235) et une excrétion dans les matières fécales (294-296).

Elles peuvent donc induire de forts dommages intestinaux suite à leurs ingestions ou inhalations et peuvent altérer le bon déroulement, équilibre de l'homéostasie intestinale, induire de l'inflammation et entraîner de la génotoxicité (297).

Les PMs peuvent être toxique suite à : i) la génération de molécules oxydantes et de métabolites réactifs à la surface des particules, ii) la libération des molécules organiques et des métaux de transition retrouvés au sein des particules, iii) la capacité des particules à activer une cascade inflammatoire, iv) la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et azotées (RNS) (298). Ces espèces peuvent être générées via un cycle redox, par la signalisation induite lors de la captation et de la phagocytose des particules par les macrophages (299-302). Cette toxicité peut être atténuée par la présence des métaux de transition à la surface de la particule (comme le fer libre, le cuivre, le zinc et le vanadium), grâce à leur propriété et leur réactivité, ils sont capables de participer à des réactions chimiques anti-oxydantes, de type Fenton (298). Par exemple, ils peuvent activer les récepteurs AhR qui va réguler l'expression de l'enzyme cytochrome P450 (CYP1a1b), et détoxifier le composé (303).



Au cours d'une réponse inflammatoire aiguë, les ROS et RNS vont permettre de contrôler, réparer et limiter les dommages induits par les PM. Mais à long terme, leur production chronique peut entraîner une cascade d'événements nuisibles, à différents niveaux biologiques. Comme ces espèces sont instables et réactives, elles peuvent induire l'oxydation de biomolécules comme les lipides, les protéines, et l'ADN (cassures de brins et augmentation du niveau de 7-hydro-8-oxo-20-déoxyguanosine (8-oxodG) (297). Ces dommages entraînent la détérioration des cellules épithéliales, l'activation de facteurs de transcription (comme NFκB) et de protéines kinases intracellulaires (comme ERK et MAPK). L'ensemble de ces éléments activés induisent la production de cytokines pro-inflammatoires (comme les IL-6, IL-10, IL-18, IL-1β et le TNF-α) et de médiateurs oxydants (malondialdéhyde -MDA- et myéloperoxydase), les chimiokines (CXCL) (304).

Ce stress oxydatif chronique est dangereux pour l'organisme car il peut conduire à une génération constante de ROS et aboutir à un épuisement des défenses cellulaires, naturellement présentes et essentielles au bon fonctionnement du système immunitaire physiologique, comme le facteur nucléaire 2 lié à l'érythroïde-2 (Nrf2) la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (Cat) : éléments indispensables à la bonne défense et régénération de l'organisme (305).

Peu d'études épidémiologiques ont étudié l'association et l'impact d'une exposition aux PMs sur l'apparition et le développement des manifestations cliniques intestinales.

Une étude menée à Singapour, a permis d'observer un lien entre une exposition aux particules atmosphériques et le grand nombre de leucocytes circulants retrouvés. Les hommes en bonne santé exposés aux émissions de diesel montraient une augmentation de l'expression du TNF-α, facteur inflammatoire impliqué dans la pathogenèse des MICI.

Des études épidémiologiques ont été effectuées pour évaluer l'association entre la pollution et les MICI et un lien entre une exposition à la pollution de l'air de manière générale et la survenue de cancer du tube digestif, des infections intestinales et des MICI a été démontré (296, 306). Une autre équipe a montré qu'il n'y a pas d'association épidémiologique entre la pollution atmosphérique et les MICI, pour les cas de MICI nouvellement diagnostiqués (17, 307).

Lors du recensement épidémiologique des hospitalisations liées aux MICI suite à un pic de pollution, un lien entre ces hospitalisations chez les adultes (81,3 hospitalisations pour 100 000 personnes par an) et la densité totale de polluants dans l'atmosphère a été établi (308). Le risque d'hospitalisation est similaire pour les rectocolites hémorragiques (RCH) et pour la maladie de Crohn (MC) (16). De manière générale, les régions urbaines sont associées à des niveaux de pollution atmosphérique plus élevés que les autres zones résidentielles, or un lien entre le fait de vivre en zone urbaine, et un taux d'incidence plus élevé de MICI existe. (309-311). Une étude menée au Manitoba a montré que les individus ayant déjà vécu dans une ferme étaient moins susceptibles de développer une MC tandis que la vie urbaine était, elle, associée à un risque plus élevé pour les deux pathologies. De même, au Royaume-Uni, les patients résidant en zone rurale développaient moins de MC ou de RCH (312).

Une étude cas-témoins européenne montre que l'exposition aux particules est associée de manière inversée au risque de développer une MICI à l'âge adulte : une exposition aux PM<sub>10</sub> réduirait le risque de MICI à l'âge adulte (313). De fortes concentrations de PM<sub>10</sub> dans les zones d'habitation ont été corrélées à une diminution du risque de développer une MC (17). Les concentrations de PM<sub>10</sub> ne semblent pas avoir modifié la fréquence d'hospitalisation pour des troubles gastro-entériques chez les enfants (314), mais impactent les visites aux urgences pour une entérite (315), une appendicite (316, 317) et un ulcère gastroduodéal (318). Une étude de cohorte, basée sur la population générale, montre que l'exposition maternelle ou précoce aux PM<sub>2,5</sub> n'est pas liée au diagnostic de MICI pédiatrique (319).

Actuellement, peu d'études ont observé l'effet des particules suite à une inhalation sur l'épithélium intestinal humain et sur l'homéostasie immunitaire. À la suite de ces études épidémiologiques, certaines recherches ont été réalisées sur des modèles animaux. Des souris gavées avec des PM<sub>10</sub> ambiantes pendant 7 à 14 jours présentent une augmentation significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, et une augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale y était associée (320). Certaines études et travaux ont démontré un rôle important du récepteur AhR au sein de l'immunité de la barrière intestinale.

Les HAP présents dans la pollution ambiante peuvent se lier à AhR et être capables de perturber significativement l'homéostasie intestinale en modulant l'équilibre entre les bactéries commensales, les dérivés des ligands d'AhR et l'équilibre épithélial des cellules Th17 et des cellules T régulatrices. (321, 322). Il existe un effet direct, de la pollution de l'air sur les cellules épithéliales : des lésions épithéliales sont retrouvées dans le colon de souris, exposées pendant 3 et 12 mois, 2 h/jour, 5 jours/semaine, aux PM urbaines commerciales (SRM 1648a, diamètre moyen 5,85  $\mu\text{m}$ , moyenne concentration de 0,4  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) ou 1 h par jour mais pendant 28 jours consécutifs aux particules ultrafines de diesel (DEP, SRM 2975, diamètre moyen 31,9 nm, 300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (248, 323).

Une altération de la barrière épithéliale intestinale a lieu suite à une exposition aux PM (PM urbaines type SRM 1649a, diamètre moyen 12,9  $\mu\text{m}$  (324), la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraîne une inflammation intestinale (augmentation de la cytokine pro-inflammatoire IL-6), associée à une augmentation de la perméabilité cellulaire, dû à un réarrangement des protéines des jonctions serrées. Une apoptose des cellules épithéliales coliques a lieu, altérant le bon fonctionnement de la barrière intestinale épithéliale (324). Cette exposition entraîne un afflux de PM et de produits microbiens dans la lamina propria, permettant de multiples interactions avec les cellules immunitaires (325). Une réponse inflammatoire induite par les cellules dendritiques et les macrophages a lieu et entraîne une inflammation systémique, modifiant l'environnement luminal de l'intestin, et permet la croissance de souches microbiennes particulières, aptes à survivre. La perméabilité intestinale peut également être augmentée suite à la production de métabolites altérés comme le butyrate, induit lors de l'ensemble de ces altérations (325).

Une exposition de souris, aux grosses particules de l'air pendant 15 jours (PM urbaines, diamètre aérodynamique de 2,1 à 10,2  $\mu\text{m}$ , inhalation 4 h/jour, 5 jours/semaine) ou aux  $\text{PM}_{2,5}$  (concentrées dans l'air ambiant à Chicago, États-Unis, 8 h/jour pendant 5 jours par semaine pendant un total de 3 semaines consécutives dans une enceinte connectée à un système polyvalent d'enrichissement en concentration d'aérosols,  $135,4 \pm 6,4 \text{ g}/\text{m}^3$  entraîne : i) la production de malondialdéhyde, ii) des lésions épithéliales sont observées, iii) une augmentation de l'inflammation et de la production de cytokines pro-inflammatoires dans le

côlon, iv) une production des molécules clés des voies inflammatoires (comme Stat3 et p65), v) une infiltration de cellules inflammatoires dans le côlon (21, 281) (248, 323).

Des souris exposées aux particules de l'air, à partir d'un système de filtration d'air urbain développent une douleur accrue et présentent une augmentation de l'IL-8 sérique pro-inflammatoire ainsi qu'une dysbiose (326) (327).

Pour contrecarrer ces effets délétères et atténuer les dommages cellulaires et tissulaires induits par une exposition aux PM, des stratégies visant à utiliser des antioxydants comme le peptide D-4F (peptide mimétique de l'apolipoprotéine AI) ou la N-acétyl-L-cystéine, se sont avérées efficaces contre le déséquilibre des voies de redox intestinales induit (21, 328).

## **b - effets des gaz**

L'exposition à la pollution de l'air induit également une exposition aux gaz atmosphériques. Ces derniers ne sont pas inoffensifs pour notre santé intestinale et possèdent également des effets délétères pour le tractus gastro-intestinal.

### **1/ Dioxyde d'azote : NO<sub>2</sub>**

La littérature scientifique montre qu'une exposition au NO<sub>2</sub> entraîne des effets contrastés sur la santé humaine avec une incidence accrue de troubles intestinaux.

A l'âge adulte, une exposition au NO<sub>2</sub> atmosphérique n'a pas d'incidence sur la survenue ou le développement de MICI (la MC ou la RCH) (313). Cependant, une étude impliquant des analyses stratifiées par âge, effectuée par Kaplan and al, a montré que des concentrations élevées de NO<sub>2</sub> étaient associées à un risque accru de MC pour les jeunes adultes de moins de 23 ans et à une diminution du risque de survenue de MC pour les adultes âgés de 44-57 ans (17). L'ensemble de ces données suggère que le NO<sub>2</sub> peut impacter le développement de la MC et de ce de manière âge spécifique. En outre, la concentration atmosphérique de NO est positivement associée aux hospitalisations pour MICI chez les adultes (16). Cette association l'est également pour une forte hospitalisation suite à des douleurs abdominales non spécifiques (307), à une entérite (315), à un ulcère gastroduodéal (17).

Pour la population juvénile, une exposition maternelle ou précoce au NO<sub>2</sub> ne montre pas d'effets significatifs sur la survenue et le risque de développer une MICI pédiatrique (319).

Cependant, des concentrations élevées de NO<sub>2</sub> dans l'atmosphère sont associées à une incidence accrue du SII et d'appendicite (Syndrome Irritable de l'Intestin) chez les enfants (329) (316, 317).

## **2/ Dioxyde de soufre : SO<sub>2</sub>**

L'analyse bibliographique effectuée, rapporte uniquement des effets négatifs d'une exposition au SO<sub>2</sub> sur la santé intestinale.

Comme pour le NO<sub>2</sub>, un effet âge a été observé pour la survenue des MICI lors d'une exposition à des concentrations élevées de SO<sub>2</sub> : une augmentation du risque de développer une RCH chez le jeune adulte de moins de 25 ans est observée (17). Une forte concentration atmosphérique de SO<sub>2</sub> est associée à une augmentation des hospitalisations de l'adulte pour des MICI (16), des douleurs abdominales non spécifiques (307) et une entérite (315). Chez les enfants de 2 ans et moins, une association significative est observée suite à une exposition à de fortes concentrations en SO<sub>2</sub> et des hospitalisations d'urgence pour les troubles gastro-entériques (314).

## **3/ Ozone : O<sub>3</sub>**

Une étude littéraire des effets intestinaux de l'exposition atmosphérique à l'ozone montre que ce dernier a des effets contrastés sur la survenue de ces troubles intestinaux.

Une exposition à de l'O<sub>3</sub> diminue le taux de fréquentation des urgences ; pour une MC chez l'adulte et pour des douleurs abdominales non spécifiques (307). À contrario, des travaux démontrent qu'un niveau élevé d'O<sub>3</sub> atmosphérique est associé à une augmentation des hospitalisations pour une appendicite (307, 316, 317, 330), une augmentation du risque d'hospitalisations pour un ulcère gastroduodéal (318), et possiblement une augmentation du risque d'appendicite perforée (330). Enfin, aucunes associations significatives entre l'exposition à de l'O<sub>3</sub> et la possible hospitalisation pour des maladies digestives ont également été observées (331).

Chez les jeunes enfants, aucun lien entre une exposition à de l'O<sub>3</sub> et le développement d'une MICI pédiatrique (319), les hospitalisations pour des troubles gastro-entériques chez l'enfant (314) n'apparaît.

#### **4/ CO**

De manière générale, après analyse, la plupart des travaux étudiant les effets du CO sur le système intestinal rapporte des effets nocifs de ce gaz dans la survenue et le développement des maladies intestinales.

Une concentration atmosphérique élevée de CO est associée à une augmentation du taux d'hospitalisations chez l'adulte pour de nombreux troubles intestinaux : les MICI (16), les douleurs abdominales non spécifiques (307), l'entérite (315), l'appendicite (316, 317) et l'ulcère gastroduodéal (318).

Chez les enfants, cette forte concentration est corrélée à un risque plus élevé de survenue du SCI (Syndrome du Colon irritable) (329). Chez le jeune enfant (de 2 ans et moins), une exposition au CO est associée aux hospitalisations d'urgence pour troubles gastro-entériques (314).

#### **c - effets des COV**

Les COV, composés organiques volatils, sont définis par un terme générique pour cibler les produits chimiques organiques dont le point d'ébullition est bas. Ces composés vont, se volatiliser facilement dans l'atmosphère à température ambiante (US EPA, 2014). Les hydrocarbures aromatiques, les composés aliphatiques, les aldéhydes, les cétones, les éthers, les acides et les alcools sont des COV (332). Les principaux composés d'intérêt sont constitués de cycles aromatiques comme le benzène, le toluène, le xylène, l'éthylbenzène, et les aldéhydes, comme le formaldéhyde et l'acétaldéhyde (333).

Aujourd'hui, il existe peu d'études épidémiologiques qui ont évalué le lien entre l'exposition aux COV et la santé intestinale, malgré leurs présences reconnues dans notre atmosphère et leur part importante dans la constitution de la pollution atmosphérique.

Une étude a cependant associé le taux d'hospitalisation pour des MICI et la densité d'émission de COV retrouvée dans l'atmosphère pour la population générale (16). Plusieurs études ont établi un lien entre les expositions professionnelles aux COV et les cancers du tube digestif. Dans une étude cas-témoins canadienne, une exposition professionnelle au toluène, au xylène ou au styrène est associée à un risque plus élevé de développer un cancer de l'œsophage, du côlon ou du rectum (334).

Une seconde étude cas-témoins a établi une association positive entre le fait de développer un cancer du rectum et une exposition à plusieurs COV comme le formaldéhyde, le tétrachlorure de carbone, le chlorure de méthylène, le trichloréthylène, l'acétone, les cétones aliphatiques, les esters aliphatiques, le toluène et le styrène (335). Une équipe a étendu ces résultats, en effectuant une autre étude cas-témoins canadienne, et a montré un risque élevé de survenue du cancer du côlon suite à une exposition professionnelle aux cétones aliphatiques, au benzène, au xylène et au toluène (336). Sur le continent européen, l'association positive entre une exposition à des COV et la survenue de cancers intestinaux est observée. Dans une étude cas-témoins réalisée en Europe du Nord, l'exposition professionnelle au benzène augmente la survenue et le développement du cancer colorectal dans le côlon ascendant et transverse (337). L'impact d'une exposition à de l'acétaldéhyde, connu comme étant un métabolite de l'éthanol, dans la cancérogenèse du tractus gastro-intestinal supérieur est connue (338). Cependant, ses effets suite à une inhalation ne sont pas encore bien étudiés et documentés tant au niveau humain qu'animal, même si deux études de cohorte étudiant les effets de nettoyeurs à sec, ont observé un risque augmenté de développer le cancer de l'œsophage suite à une exposition au perchloroéthylène (339, 340).

#### **d - effets des nanoparticules**

Une fois inhalées, le devenir des nanoparticules a été étudié dans les poumons, le cerveau, au niveau systémique, mais n'est pas bien connu dans le tube digestif. Cependant, par les mécanismes de protection pulmonaire, les particules inhalées peuvent être redirigées vers le tractus intestinal via le processus de clairance mucociliaire, les nanoparticules peuvent également se voir piégées par les cils du tractus respiratoire. Certaines études ont observé et détecté des traces de nanoparticules après inhalation : traces de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  dans les selles (341), des traces de nanoparticules d'Ag dans les matières fécales (342), des nanoparticules de  $\text{SiO}_2$  et  $\text{TiO}_2$  dans des tissus humains (jéjunum et iléon) (343). Comme les nanoparticules peuvent être transportées et retrouvées dans la circulation sanguine, elles impactent, altèrent le fonctionnement de l'organisme entier par contact direct, ou par diverses voies indirectes (240, 344).





## **B - EFFETS DES POLLUANTS ATMOSPHERIQUES SUR LE MICROBIOTE**

### **INTESTINAL**

Les polluants peuvent affecter la physiologie de l'intestin en modifiant la composition du microbiote intestinal.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, produits incomplets de la combustion et retrouvés dans les particules de l'air urbain, dans les viandes grillées et les fumées, sont transformés par les micro-organismes intestinaux en benzopyrène et autres composés imitant l'activité de l'hormone ostrogénique (345, 346). Le microbiote intestinal joue un rôle dans la bioactivation des composés inorganiques présents dans la matière particulaire, dangereux car susceptibles de provoquer et d'induire divers problèmes de santé ou de contribuer au développement de maladies chroniques. Le microbiote intestinal peut également métaboliser d'autres produits chimiques environnementaux, comme les nitrotoluènes, pesticides, métaux, colorants azoïques et mélamine (347).

Des souris exposées oralement à des particules montrent une altération de l'homéostasie intestinale. Lorsque des souris IL10 KO reçoivent ces particules dans leur bol alimentaire, l'abondance relative de *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Verrucomicrobia* en est altérée (324). Une augmentation de la production dans le caecum d'acides gras à chaîne ramifiée, isovalérate et isobutyrate (288), et une diminution de la concentration de butyrate (acide gras essentiel pour les colonocytes et les cellules immunitaires de la muqueuse) sont observées. L'épuisement du butyrate est associé à l'apparition de dommages au sein de la barrière intestinale, à une perturbation de sa fonction et à une augmentation de l'inflammation des muqueuses (348). Lorsque des souris sont exposées à des polychlorés biphényles (PCB), la composition et les processus métaboliques associés au microbiote intestinal sont également altérés.

Pour les particules inhalées, il a été observé qu'elles altèrent l'intestin, et la composition et les fonctions de son microbiote (320).

Dans l'état de la littérature scientifique actuelle, quatre études montrent une association entre une exposition aux polluants atmosphériques et des modifications du microbiote intestinal. Les deux premières études ont été menées sur des populations présentant une maladie métabolique. La pollution de l'air liée au trafic autoroutier est corrélée à une diminution des *Bacteroidaceae* et à une augmentation de la famille de *Coriobacteriaceae* chez

les adolescents en surpoids et obèses (349). L'association entre l'exposition aux PM et les modifications du microbiote intestinal chez l'homme est, d'autre part, établie (350). Sur un total de 6627 adultes, avec ou sans diabète de type 2, originaires du sud de la Chine, l'exposition aux PM<sub>2,5</sub> et à une pollution par des particules de diamètres aérodynamiques <1 µm (PM<sub>1</sub>), était négativement associée aux indices de diversité alpha du microbiote intestinal et à l'abondance des *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Verrucomicrobia* mais était associée à plusieurs taxons au sein des phylums *Bacteroidetes*.

Les deux dernières études ont, quant à elles, été menées chez des sujets sains. La troisième étude a démontré des associations significatives entre une exposition aux polluants atmosphériques et une modification du microbiote intestinal des jeunes adultes résidant dans le sud de la Californie: i) au niveau du phylum le pourcentage de variation de la composition bactérienne intestinale était de 4,0 % pour les oxydes d'azote totaux (NO<sub>x</sub>, de 4,4 % pour le NO<sub>2</sub>, et de 11,2 % pour les concentrations d'O<sub>3</sub>), ii) au niveau de l'espèce, l'exposition à l'O<sub>3</sub> entraînait 5,4 % de variation dans la composition bactérienne intestinale (351).

La dernière étude a examiné l'association entre l'exposition aux HAP atmosphériques et la diversité du microbiote, une corrélation positive est observée entre l'abondance du genre *Micrococcus* au sein des *Actinobactéries* et les niveaux de HAP, de haut poids moléculaire, comme le dibenzo(a,h)anthracène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène, l'abondance de genres de type *Bacillus* (*Firmicutes*) dans l'atmosphère et les HAP de faible poids moléculaire, notamment l'anthracène, le fluoranthène, le fluorène et le phénanthrène (352).

L'exposition aux HAP semble perturber le microbiote commensal en déséquilibrant le bon fonctionnement des voies de signalisation cellulaire (comme le métabolisme des lipides par exemple).

En conclusion, l'exposition à divers polluants atmosphériques par inhalation est associée à des modifications du microbiote intestinal chez l'homme.

Des études ont été menées sur des modèles animaux visant à confirmer, ou non, les données épidémiologiques humaines et à apporter des éléments supplémentaires dans la compréhension du mécanisme induit par ce type d'exposition. L'exposition aux particules de l'air chez la souris augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales et la libération de cytokines inflammatoires, augmentant la perméabilité

intestinale globale, créant ainsi un dysbiose intestinale (281). La composition du microbiote est modifiée tout au long du tractus gastro-intestinal, avec une dysbiose plus importante des parties proximales aux parties distales et une altération de l'abondance de certains taxons bactériens par rapport à d'autres.

Une exposition des souris aux  $PM_{2,5}$  ambiantes montre : i) une réduction significative des *Firmicutes* tout au long du TGI, expliquer, par la disparition du genre *Lactobacillus*, traditionnellement considéré comme un commensal bénéfique promouvant l'homéostasie intestinale, ii) une augmentation significative de la famille S24\_7 (ordre *Bacteroidales*), présentant une capacité de dégradation des glycanes de l'hôte très élevé, processus probablement impliqué dans la dégradation de la couche de mucus et donc dans l'induction de la perméabilité intestinale. La modification de la composition du microbiote intestinal sur des souris exposées aux DEP pendant 1 h/jour a également été observée : l'abondance de *Lactobacillus* dans les fèces augmente transitoirement après une exposition de 7 jours, pour finir par diminuer jusqu'à la fin d'une exposition de 28 jours (248). C'est la première preuve d'un effet causal de ce type d'exposition sur le microbiote intestinal. Des expériences de transplantation de microbiote fécal de souris exposées au DEP sur des souris non exposées montrent que ces souris saines présentent à leurs tours le même type de lésions épithéliales observées sur les souris exposées.

Un équilibre adéquat entre la muqueuse intestinale, le système immunitaire et le microbiote intestinal est donc essentiel pour maintenir l'homéostasie intestinale. La rupture de cette symbiose peut entraîner et induire des maladies.

Les effets délétères intestinaux dus à l'inhalation de particules atmosphériques, ont été étudiés chez plusieurs modèles murins génétiquement modifiés présentant des pathologies spécifiques. Dans les modèles d'athérosclérose, dans le modèle murin *Ldlr-KO*, une exposition aux UFP urbains (5 h/jour, 3 jours/semaine pendant 10 semaines en chambre d'exposition corps entier) entraîne une augmentation des produits oxydatifs des acides arachidoniques et linoléiques, et une diminution de la longueur des villosités. Chez les souris Apolipoprotéine E-KO exposées aux gaz d'échappement diesel (6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 2 semaines), l'augmentation des produits oxydatifs des acides arachidoniques et linoléiques est observée (247, 259). Une diminution de l'expression de *Muc2* et des protéines des jonctions serrées est observée chez des souris déficientes en apolipoprotéine E soumises à un régime

riche en graisses après exposition à la fumée de bois (WS,  $\sim 450 \text{ g/m}^3$ ) ou après exposition à un mélange d'échappement de véhicules diesel et essence (MVE,  $300 \mu\text{g/m}$ , 6 heures par jour, 7 jours par semaine, pendant 50 jours) (247, 353). Une diminution de la diversité bactérienne intestinale suite à l'exposition des souris au WS et au MVE, avec une altération du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* apparaît.

Ces modèles permettent d'établir qu'une exposition aux PM induit une inflammation avec : i) l'augmentation de l'expression de MMP-9, TLR-4 et des cytokines chez les souris déficientes en ApoE exposées au WS ou au MVE, ii) l'infiltration de macrophages et de neutrophiles dans les villosités intestinales des souris Ldlr-null exposées à l'UFP.

Des études similaires mais sur un autre type de modèle murin ont été effectuées. Des souris transgéniques APP/PS1, modèle murin pour de la maladie d'Alzheimer, et exposées aux  $\text{PM}_{2,5}$  (8 semaines, inhalation type corps entier de l'air ambiant situé à Taiyuan, en Chine, concentration moyenne de  $\text{PM}_{2,5}$  de  $61 \text{ g/m}^3$ ) montrent que ce type d'exposition aggrave les dommages histopathologiques intestinaux initialement présents, stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et augmente les indices de Shannon, Simpson, Chao1 et de couverture basés sur l'abondance (ACE) induisant des variations d'expression des gènes vitaux et des voies métaboliques de la communauté bactérienne (354). Cette étude a, donc, indiqué que la susceptibilité intestinale initialement présente chez les souris développant la maladie d'Alzheimer, était aggravée par l'exposition aux  $\text{PM}_{2,5}$ . Dans un modèle murin de cancer colorectal, l'exposition aux particules urbaines (SRM 1648a) a montré une activation de la voie PI3K/AKT, déclenchée par FGFR4, entraînant une augmentation de la formation des tumeurs colorectales (323). Une exposition au DEP induit une régulation positive de l'expression de l'anhydrase carbonique, une glycoprotéine impliquée dans le développement du cancer colorectal (248).

Bien que les études humaines fassent encore défaut, ou restent plutôt rares sur ce sujet, les résultats obtenus dans les modèles animaux, ainsi que la généralisation de la pollution de l'air dans les villes d'aujourd'hui, soulèvent le fait que ce facteur environnemental puisse contribuer de manière significative aux différents problèmes de santé, potentiellement liés au microbiote intestinal. Au-delà des métaux, de nombreux gaz toxiques et autres composés chimiques peuvent être présents dans l'air pollué.

Ces composés pourraient, eux aussi, avoir des effets sur la modulation de la composition, richesse et diversité du microbiote intestinal. Cependant, à ce jour, leur rôle potentiel dans la contribution aux dysbioses intestinales dues à une pollution atmosphérique moderne, n'est pas encore réellement bien connu.



## **C - FENETRE DE SUCEPTIBILITE GESTATIONNELLE**

La pollution de l'air est associée à une perméabilité accrue et à une inflammation du TGI. Ces effets ont probablement un impact important sur le système intestinal des femmes enceintes exposées (324). Les événements de translocation bactérienne à travers la barrière intestinale, le déséquilibre de l'homéostasie intestinale pourraient être exacerbés et atteindre l'intestin du fœtus, se propageant et altérant le microbiote du nourrisson.

Aujourd'hui, au sein de la littérature scientifique, de plus en plus de preuves existent en faveur de l'existence d'une fenêtre de sensibilité. En phase gestationnelle, il semble exister une période spécifique d'exposition *in utero*, appelé fenêtre de susceptibilité à la pollution de l'air et à ses effets. Une exposition lors de cette dernière, potentialiserait les effets délétères du ou des polluants et des altérations physiologiques seraient par la suite observées sur l'organisme du nourrisson, du jeune enfant ou de l'enfant. L'exposition à la pollution de l'air, tôt dans la vie, est directement liée au développement de risques cardiovasculaires majeurs, notamment l'obésité, l'hypertension et les troubles métaboliques. Il a été démontré à plusieurs reprises qu'une exposition à la pollution atmosphérique est associée dans la descendance à de nombreux déficits, nombreuses pathologies : asthme et allergies respiratoires ; eczéma et dermatite atopique ; dysfonctions cardiaques ; autisme, problèmes neuro-développementaux, santé mentale ; déficits immunitaires (355-360). Une exposition aux  $O_x$  au cours du deuxième trimestre de la grossesse est associée au développement de maladies inflammatoires de l'intestin chez l'enfant exposé *in utero* ( $O_x$  : valeur moyenne du potentiel red-oxy de  $NO_2$  et  $O_3$  et pondéré à chacun des polluants) (319). Cependant, malgré le rôle émergent de la pollution de l'air dans les pathologies intestinales, les études animales portant sur les altérations induites par une exposition *in utero* à la pollution de l'air sur la structuration et la fonction du système intestinal font défaut. Les données montrent que l'exposition en phase gestationnelle à la pollution atmosphérique potentialise dans la descendance le développement de pathologies liées au système immunitaire. Peu d'étude ont exploré à ce jour les effets de l'exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique sur le système immunitaire intestinal.





## 1 – Définitions et Généralités

Les MICI, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin regroupent deux maladies distinctes : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) (10, 11) (figure 14). Ces maladies sont chroniques et présentent des troubles inflammatoires récurrents de l'appareil gastro-intestinal (12). Ces maladies inflammatoires du système digestif évoluent par poussées inflammatoires de durées variables entrecoupées par des phases de rémission. Les MICI sont le résultat d'un système immunitaire dérégulé, et ce notamment chez un individu génétiquement prédisposé.

La Maladie de Crohn se caractérise par une inflammation locale survenant n'importe où le long du système gastro-intestinal, pouvant également inclure un rétrécissement luminal de l'intestin, ou une perforation intestinale, une fistule, une masse inflammatoire/abcès, et avec une possible maladie périanale (361, 362).

La Rectocolite Hémorragique est caractérisée par une inflammation de la muqueuse colique le long du côlon, impliquant le rectum.

Ce sont des maladies très invalidantes présentant des symptômes tels que des épisodes diarrhéiques, des douleurs abdominales, un amaigrissement progressif, une fatigue excessive, de la fièvre et des signes cliniques d'occlusion intestinale. En outre, les patients atteints d'une MICI présentent un risque accru de développer d'autres troubles inflammatoires chroniques, comme le psoriasis et la cholangite sclérosante primitive (309, 363).

Les MICI affectent près de 4 millions de personnes dans le monde et sont connues comme étant fortement retrouvées dans les pays industrialisés, en effet plus d'un million d'américains (1,4 millions (364)) et 2,5 millions d'européens souffrent d'une MICI (365). Ces pathologies sont de plus en plus retrouvées au sein de la population française, avec notamment une augmentation drastique au niveau pédiatrique démontrée dans le Nord-Ouest de la France (15).

Ces MICI représentent un véritable problème de santé publique compte tenu de leurs répercussions sur la qualité de vie des malades, de leurs pronostics à court et à long termes, du coût de leurs prises en charge ainsi que de leurs fréquences (365).

# MICI : MALADIE DE CROHN ET RCH



\* MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin, RCH : Rectocolite hémorragique

NOMBRE DE MALADES :

## 10 MILLIONS DANS LE MONDE

## 3 MILLIONS EN EUROPE

## 250 000 EN FRANCE



- HAUTE
- INTERMÉDIAIRE
- BASSE

---

### 8000 NOUVEAUX CAS CHAQUE ANNÉE



**1 CAS DIAGNOSTIQUÉ TOUTES LES HEURES**  
**20 % SONT DES ENFANTS**

### QUEL ÂGE ?

**PIC DE DIAGNOSTIC ENTRE 15 ET 35 ANS**

**Des maladies qui ont doublé chez les 13-19 ans**  
(www.sciencedirect.com)

**Une MICI chez l'enfant ou l'adolescent est souvent responsable d'un ralentissement de la croissance**

## CAUSES DE CES MALADIES : Aucune cause identifiée

Plusieurs gènes de susceptibilité mais aussi des facteurs environnementaux sont suspectés ainsi que des modifications de la flore intestinale ( sources : [presse.inra.fr](http://presse.inra.fr)). De nombreuses études sont en cours, sur le rôle de l'environnement notamment : la pollution, les additifs alimentaires, les effets des antibiotiques durant l'enfance, l'hygiène de vie dans les pays industrialisés.

### PARTIES DU CORPS TOUCHÉES

**CROHN :**  
Sur les différents segments du tube digestif de la bouche jusqu'à l'anus

**RCH :**  
Rectum  
Côlon



### SYMPTÔMES

**Inflammation du tube digestif provoquant :**

- Douleurs abdominales
- Diarrhées ( Entre 4 et 20 selles par jour)
- Impériosité des selles
- Perte d'appétit et amaigrissement
- Grande fatigue
- Fièvre

Alternance entre phase de poussée (**crise**) et de rémission

**SYMPTÔMES EXTRA DIGESTIFS**  
L'inflammation peut se localiser en dehors de l'intestin et provoquer des manifestations rhumatismales, oculaires et/ou cutanées.

## 2 MALADIES QUI NE SE GUÉRISSENT PAS

**Objectif des médicaments existants :**  
Agir sur la poussée de la maladie selon la sévérité des lésions



Aminosalicylés, corticoïdes, immunomodulateurs, biothérapies

**Chirurgie :**  
Elle n'est pas curative mais peut soulager les malades

**CROHN :** 1 Malade sur 2 est opéré dans les 10 ans suivant le diagnostic

**RCH :** 1 Malade sur 3 dans les 20 années suivant le diagnostic (source : [www.proktos.com](http://www.proktos.com))



Figure 14 : Les MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin  
Source : afa.asso

Ces maladies sont des maladies modernes et contemporaines qui ont émergé dans les pays occidentaux durant la deuxième partie du 20<sup>e</sup> siècle. Cependant depuis quelques années, les pays nouvellement industrialisés en Asie, au Moyen-Orient, en Afrique et en Amérique du Sud ont, eux aussi, été témoins d'une augmentation rapide de sa prévalence. En effet, l'urbanisation l'occidentalisation du mode de vie et l'industrialisation des sociétés sont associées à des changements dans les habitudes et les modes de vie des populations. Le régime alimentaire, l'usage et l'état d'hygiène, les expositions microbiennes et les pollutions, sont notamment des facteurs impliqués comme étant de potentiels facteurs de risques environnementaux de MICI (13, 366) (14) (367-369). Ces maladies semblent donc être dues à une association de facteurs d'origine génétique mais également environnementale.

### **Les facteurs génétiques**

L'importance de la susceptibilité génétique a été établie au cours de la dernière décennie et certains variants génétiques ont été identifiés. L'étiologie génétique des MICI est complexe et considérée comme polygéniques. À l'échelle du génome, les études d'association (GWAS) suggèrent que la dérégulation de l'immunité innée et adaptative contribue au développement de ces pathologies. Des variantes de sensibilité ont été identifiées dans les gènes associés à l'autophagie (ATG16L1), la voie interleukine IL-23/Th17 (IL-12B), la voie du TGF- $\beta$  (SMAD3), l'activation des cellules T (TAGAP), le récepteur NOD2, etc (370-372).

Plus de 200 loci génétiques ont été identifiés, mais peu se trouvent fortement associés aux MICI. La contribution des effets génétiques au développement de MICI semble être inférieure à 50 %, l'effet étant plus important pour la MC que pour la RCH.

Cependant, l'absence d'implication d'un gène complet et l'augmentation rapide de l'incidence des MICI dans certaines zones géographiques suggèrent que l'interaction entre les prédispositions génétiques et les facteurs environnementaux contribuent au développement des MICI.

### **Les facteurs environnementaux**

L'analyse épidémiologique des MICI de manière temporelle et spatiale, a suggéré que les facteurs environnementaux jouent un rôle majeur et déterminant dans cette pathogénèse pouvant modifier l'expression de la maladie (14).

Cette importance de l'environnement est soulignée par l'augmentation des taux d'incidence dans les pays initialement moins touchés, et notamment auprès des groupes ethniques comme les Asiatiques et les Hispaniques (373). Cette prévalence se retrouve également pour les immigrants partant de régions à faible incidence vers des régions avec une incidence plus élevée (374). Il est aussi constaté que les MICI sont plus courantes dans les centres urbains (375). Dans une étude de cohorte suisse, les individus vivant en zone urbaine avaient à la fois plus de risque de développer la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (risque relatif (RR) 1,49,  $P < 0,001$  ; RR 1,63,  $P < 0,001$ , respectivement) (310). De 1960 à 2005, une période de croissance, il y a eu des augmentations de MICI de 2,4 % (IC à 95 % 2,1 à 2,8 % ;  $P < 0,001$ ) et 3,6 % (IC à 95 % 3,1 à 4,1 % ;  $P < 0,001$ ) par an dans les pays industrialisés (375). L'effet des environnements urbains et leur impact sur le développement des MICI est particulièrement flagrant dans les pays industrialisés et ceux en cours d'industrialisation et d'occidentalisation durant de la dernière décennie. Bien que l'incidence globale et la prévalence reste nettement inférieure à celle de l'hémisphère ouest, les données sur la morbidité liée à la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique apparaissent en augmentation dans les pays développés et en développement sur le continent asiatique. De même, des données issues du ministère de la Santé Japonais, ont montré une augmentation importante de l'incidence de la maladie de Crohn et des ulcères depuis les années 1970, données confirmées par des données similaires en Corée du Sud, Chine et Inde (368).

L'effet de l'urbanisation sur le développement des MICI pourrait être médié par une variété de changements. En effet, cette modernisation de notre société a affecté la vie des populations en changeant les modes de vie, en laissant notamment une large place à la carrière et l'enseignement supérieur (376), moins de femmes allaitent (377), il y a de plus en plus de familles plus petites et les conditions de vie sont plus faciles, les familles sont moins surpeuplées, l'hygiène est plus accessible, l'eau est assainie, plus disponible et de meilleure qualité (376) ... L'adoption d'un mode de vie sédentaire (378), l'exposition à pollution de l'air (17), la consommation d'un régime occidental (379) riche avec des plats cuisinés (contenant souvent des quantités excessives de sucre et de graisses polyinsaturées), et l'usage accru du tabac sont des éléments pouvant être impliqués et reliés à la survenue et au développement des MICI.

De manière générale, il est donc admis que le développement d'une MICI résulte d'une exposition à un ou plusieurs facteurs environnementaux chez un hôte génétiquement prédisposé. Ces expositions entraînent donc chez ces personnes une dérégulation immunitaire provoquant alors une réponse aberrante conduisant à une inflammation intestinale.

Les facteurs de risques environnementaux les plus connus et les plus documentés sont :

- le tabagisme : le facteur de risque environnemental le plus connu pour la MC et un facteur de risque établi dans la plupart des études sur la RCH
- le régime alimentaire : en partie parce qu'il a également été utilisé comme thérapie
- la dysbiose intestinale et l'exposition à des agents pathogènes
- les facteurs de stress psychosociaux
- les médicaments tels que les AINS, les antibiotiques et contraceptifs oraux.

*Le tabagisme* est l'une des substances toxiques dont l'effet sur la pathogenèse des MICI est le plus étudié. La relation établie entre le tabagisme et les MICI a été étudiée et démontrée à travers les répartitions géographiques des taux d'incidence de ces pathologies et elle est donc corrélée à l'urbanisation et l'industrialisation des pays occidentaux et des pays en voie de développement asiatique. Cependant, les données épidémiologiques montrent des effets opposés entre la MC et la RCH. En effet, le tabagisme est protecteur pour la RCH, tout en présentant un risque accru de développer une MC (380, 381). Ce type d'effet totalement opposé pour ces deux maladies est retrouvé uniquement pour ce facteur de risque qu'est le tabagisme. Pour la RCH, des études ont démontré une durée de vie de trois fois supérieure chez les non-fumeurs atteints d'une RCH par rapport aux fumeurs atteints de RCH. En outre, le tabagisme précoce semble augmenter considérablement le risque de développer la maladie (11). Une publication récente a identifié 64 SNP pour lesquels le facteur tabac modifiait le lien existant entre un SNP et les MICI. Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism), correspondent à des variations mineures du génome au sein d'une population où un seul nucléotide est modifié. Le gène à l'origine de l'association entre tabagisme et MICI est apparu lors d'études sur deux modèles de colite, présentant également un déficit génétique en IL-10 et NOD2.

Ces deux gènes ont donc été identifiés comme présentant une interaction potentielle entre le tabagisme et la possibilité de développer une MICI (382).

### **MICI et microbiote**

Depuis quelques années, un intérêt particulier se porte sur l'influence de l'environnement sur la composition du microbiote intestinal qui pourrait être un acteur central dans le développement et la propagation de l'inflammation responsable des MICI (138). Parmi les 200 gènes susceptibles d'être associés aux MICI, certains sont connus pour être impliqués dans la médiation des réponses de l'hôte et du microbiote intestinal, évoquant alors la possibilité que le microbiote intestinal soit impliqué dans la pathogenèse des MICI (383). De nombreuses études ont observé et démontré que la composition du microbiote est altérée chez un sujet malade (atteints de MICI, du syndrome de l'intestin irritable, d'allergies, l'asthme, du syndrome métabolique, et de maladies cardiovasculaires) par rapport à celui des sujets sains (384-387). En effet, une exposition au monde extérieur, de la naissance à l'âge adulte modifie sans cesse la composition, la structure et la fonction du microbiote intestinal, modulant ainsi le risque et l'histoire des maladies de l'hôte tout au long de sa vie (388, 389).

## **2 – L'axe poumon - intestin : un élément clé et essentiel dans la survenue des MICIs ?**

### **A - GENERALITES**

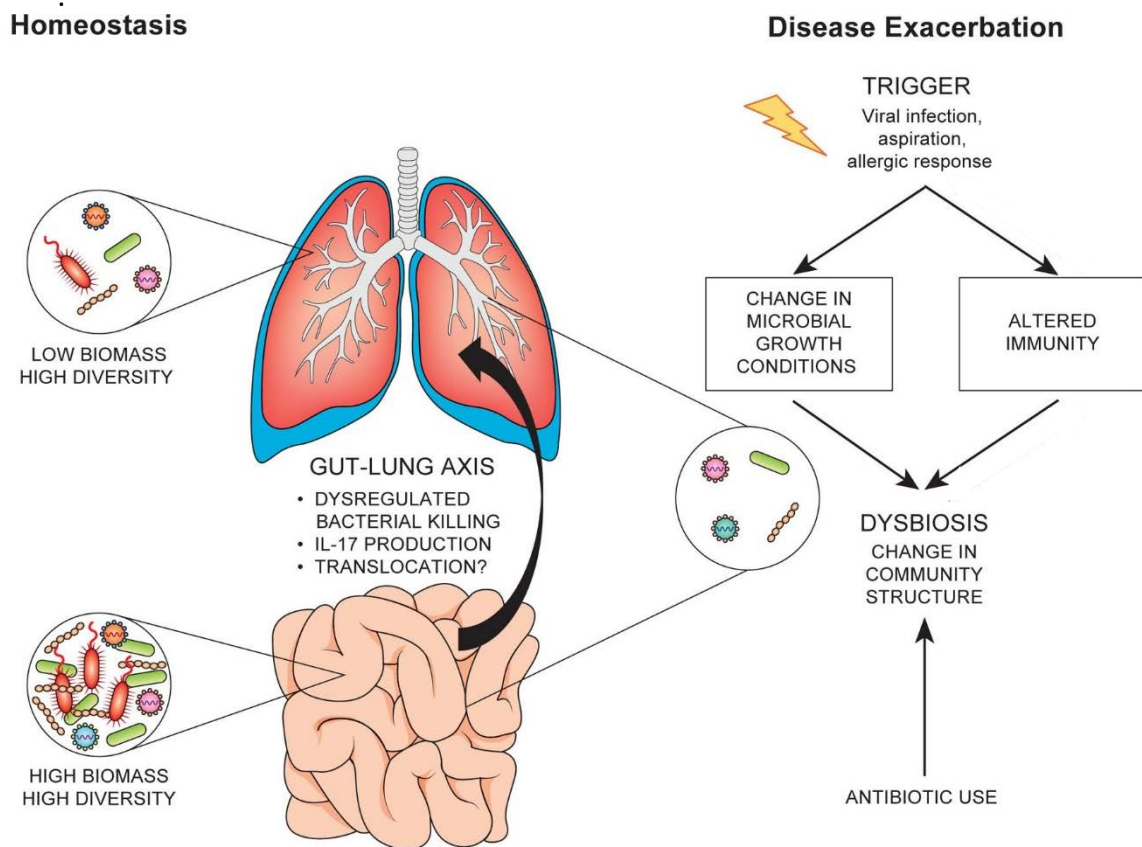
L'organisme humain possède plusieurs spécificités dont le fait d'être constitué d'un microbiote. Ce microbiote comprend les diverses communautés microbiennes résidant dans tout l'organisme (intestin, peau, bouche, voies respiratoires et vagin (390).

La majorité de ces éléments microbiens est présente dans le tractus gastro-intestinal et est essentielle pour notre bonne santé (94). Une altération de la bonne composition de ce microbiote ou dysbiose (cf. plus haut) est associée à une multitude de problèmes de santé affectant non seulement le tractus gastro-intestinal, mais également des organes plus éloignés comme la bouche, les poumons, le cerveau, le foie, le vagin, etc. (94).



La communauté bactérienne intestinale présente une machinerie enzymatique spécifique qui lui permet d'assimiler un ensemble de nutriments dont la digestion entraine la libération de métabolites ayant de multiples fonctions chez l'hôte (133), en influençant le fonctionnement de divers organes de l'organisme (391, 392).

Des travaux récents indiquent qu'il existe un lien de communication et d'échange entre le microbiote intestinal et l'immunité pulmonaire pouvant notamment expliquer la survenue de pathologies pulmonaires lors d'une dysbiose intestinale et vice versa (391, 392) (figure 15). De plus, les deux tissus, respiratoires et intestinaux, partagent la même origine embryonnaire, de nombreux phylums microbiens communs (*Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Protéobactéries*) et sont tous deux composés de cellules épithéliales.



**Figure 15 : Possible régulation des altérations intestinales via l'axe poumon-intestin**

Au cours de l'homéostasie, le microbiote pulmonaire est principalement caractérisé par une faible biomasse mais une diversité importante d'espèces microbiennes. En revanche, le microbiome intestinal sain se caractérise par une grande diversité et une biomasse élevée. Lors de l'homéostasie, le microbiote intestinal aide à façonner le développement de l'architecture lymphoïde et une réponse immunitaire appropriée. La perte de la diversité intestinale (par exemple à la suite d'une infection virale ou de l'utilisation d'antibiotiques) peut entraîner une dérégulation de l'IL-17 ou des mécanismes de destruction bactérienne entraînant une altération de la fonction des macrophages alvéolaires et la prolifération d'organisme pathogène. Certaines maladies pulmonaires chroniques peuvent être dues à la translocation et/ou à l'expansion du contenu bactérien de l'intestin. Les atteintes directes aux poumons (par exemple, une infection virale ou une aspiration) peuvent exacerber la maladie en partie via leurs effets sur le microbiote

## **B - L'ELABORATION DE L'AXE POUMON-INTESTIN ET SON MAINTIEN**

La première preuve de communication pulmonaire-intestinale a été rapportée il y a près de 50 ans par Turner-Warwick. Plus tard, Kraft et son équipe ont observé le développement de maladies bronchopulmonaires chroniques sévères chez les patients atteints de MICI, des années après le diagnostic. L'accumulation de données scientifiques a mis en évidence l'influence du microbiote intestinal sur l'immunité pulmonaire : on parle alors de l'axe poumon-intestin (392).

De nombreuses recherches ont pour objectif de mieux comprendre l'influence du microbiote commensal intestinal sur le développement et l'apparition de lésions pulmonaires, le développement des allergies et plus récemment, de son rôle direct dans la promotion de la tolérance aux aéroallergènes chez les nouveau-nés (393-395). Il a ainsi été constaté dans le cadre d'une étude chez l'animal que des changements dans la composition du microbiote intestinal chez la mère (396, 397) ou le nourrisson (398, 399), suite à l'administration d'un régime alimentaire ou d'antibiotiques, peuvent avoir de profonds effets, et impacter à long terme le développement ultérieur d'allergies dans la descendance. Chez l'homme, il a été observé qu'une faible diversité du microbiote intestinal dans la petite enfance est un facteur de risque important dans le développement d'allergies et de l'asthme (400) mais également que le développement de l'asthme infantile peut être associé à une abondance de *Clostridia* intestinale par rapport à *Bifidobactéries* (401, 402).

Comme déjà dit précédemment (cf paragraphe système immunitaire intestinal), la production des sous-produits métaboliques dérivés de la fermentation des fibres alimentaires par les bactéries intestinales est considérée comme essentielle dans le maintien du système immunitaire et de l'homéostasie des tissus (403). Les acides gras à chaîne courte (**AGCC autrement appelés Short-chain fatty acid SCFA**) sont ainsi reconnus comme ayant des fonctions immunomodulatrices au niveau physiologique (404). Il en résulte que divers régimes alimentaires peuvent avoir un impact sur la santé pulmonaire et le développement de maladies (405).

Les facteurs environnementaux liés au mode de vie et à la pollution sont susceptibles de perturber cet axe poumon-intestin. En effet, parmi des individus non-fumeurs, ceux souffrant de troubles pulmonaires (bronchite chronique, bronchectasie et bronchopneumopathie obstructive dysfonctionnement) montrent de manière simultanée une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (406).



Cette relation est confortée par l'observation que 57,6 % des patients atteints de rectocolite hémorragique présentent également une insuffisance pulmonaire par rapport aux témoins sains.

La pollution de l'air responsable de troubles pulmonaires constitue un autre facteur de risque accru de complications gastro-intestinales. En effet, une étude récente a montré que les maladies respiratoires (asthme, BPCO) déclenchées/exacerbées par la pollution de l'environnement, induisaient une dysbiose pulmonaire et intestinale qui se caractérisait par l'excroissance des protéobactéries et *Firmicutes* et la réduction des *Bacteroidetes* (392). Un des mécanismes évoqués dans l'initiation de l'interaction entre les poumons et l'intestin, est la présence de métaux et pathobiontes à la surface des PM. Ces derniers peuvent, en effet, se déposer dans les poumons et induire une inflammation ainsi que la libération de toxines, endommageant l'épithélium respiratoire et le microbiote. De plus, ces composants peuvent être absorbés par les cellules et atteindre la circulation sanguine, pouvant donc se déplacer vers différents organes, comme le tube digestif. Dans l'intestin, les micro-organismes et les métaux peuvent induire une dysbiose et compromettre la structure intestinale, et ses fonctions via la production de stress oxydatif et une inflammation locale. Par ailleurs, la réponse inflammatoire pulmonaire engendrée suite à une exposition aux PM, induit une « fuite » des cellules immunitaires activées vers d'autres organes, par la circulation sanguine. Elles peuvent ainsi atteindre l'intestin et transformer une réponse inflammatoire locale en une inflammation systémique. À son tour, ce processus inflammatoire peut compromettre la fonction des jonctions serrées et induire le passage systémique de métabolites d'origine intestinale entraînant le recrutement des cellules immunitaires dans les tissus, et aggravant l'état inflammatoire (407).

L'utilisation d'antibiotiques à large spectre entraîne une altération de l'expression de certaines communautés bactériennes intestinales, qui peuvent alors engendrer une prédisposition au développement des maladies allergiques des voies respiratoires (408, 409). Ainsi, l'administration de néomycine, permettant d'éliminer les bactéries intestinales y étant sensibles, entraîne une augmentation de la susceptibilité à l'infection pulmonaire par le virus de la grippe (92).

Des études sur des modèles murins ont montré qu'une déplétion de certaines espèces bactériennes intestinales, induites par l'administration d'antibiotiques, augmente à la fois la prédisposition de développer des maladies du tractus respiratoire mais également les infections virales pulmonaires (92, 410).

Ainsi, des variations dans la composition du microbiote intestinal semblent perturber la bonne cohérence de l'axe poumon-intestin. Ces perturbations peuvent avoir des influences plus profondes sur les réponses immunitaires et la susceptibilité de développer ces maladies pulmonaires et/ou intestinales (411).

### **C - LE MICROBIOTE DES VOIES AÉRIENNES**

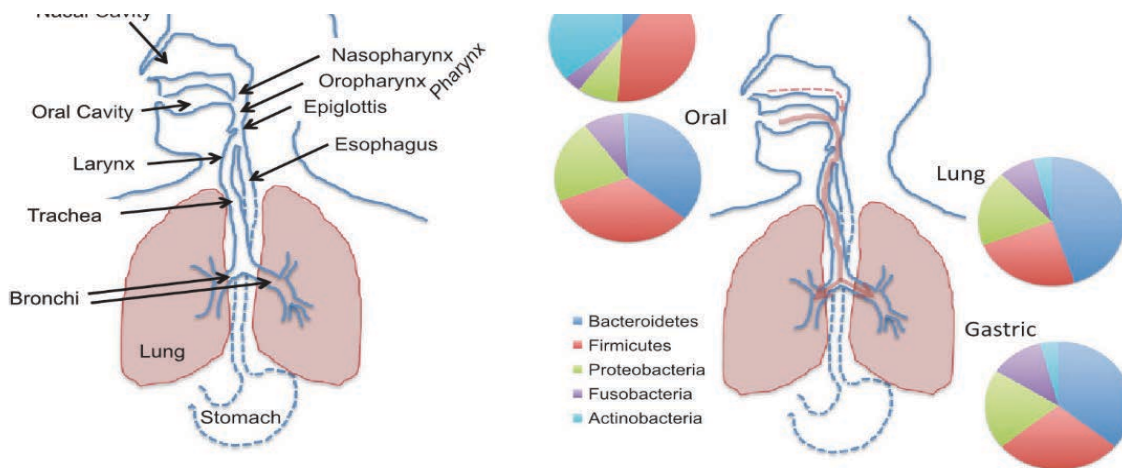
Par rapport au microbiote intestinal, les études sur le microbiote pulmonaire en sont encore à leurs débuts. En effet, il a longtemps été considéré que les voies respiratoires inférieures étaient « stériles », et ce notamment suite à l'échec de culture des communautés bactériennes pulmonaires issues d'individus sains. Cependant l'avancée technologique sur les techniques de séquençage a permis de détecter de l'ADN microbien dans les poumons d'individus sains (412). Il a été démontré que des bactéries ainsi que des organismes non bactériens, y compris des virus (virome) et des champignons (mycobiome) sont présents dans les poumons humains sains (413) (414, 415). Toutefois, des limitations techniques comme les méthodes d'échantillonnage, la contamination oropharyngée lors du prélèvement, et les faibles charges microbiennes ont remis en cause l'identification et l'établissement d'un microbiote résident et permanent, dans les voies respiratoires inférieures, vis-à-vis d'une communauté bactérienne présente transitoirement (416). Il est important de noter que la composition du microbiote pulmonaire diffère significativement entre les voies respiratoires supérieures et inférieures chez les individus sains (417).

L'origine de ce microbiote pulmonaire a été questionnée et des études suggèrent qu'il se formerait par micro-aspiration du microbiote de l'oropharynx, et élaborant alors la partie supérieure des voies respiratoires (URT) du poumon (418, 419) (figure 16 et 17).

Gollwitzer et al ont déterminé que le **microbiote des voies respiratoires se forme rapidement après la naissance, et atteint sa maturité dans les 2-3 semaines post-natales chez la souris** et dans les 2-3 mois après la naissance chez l'Homme (395, 420).

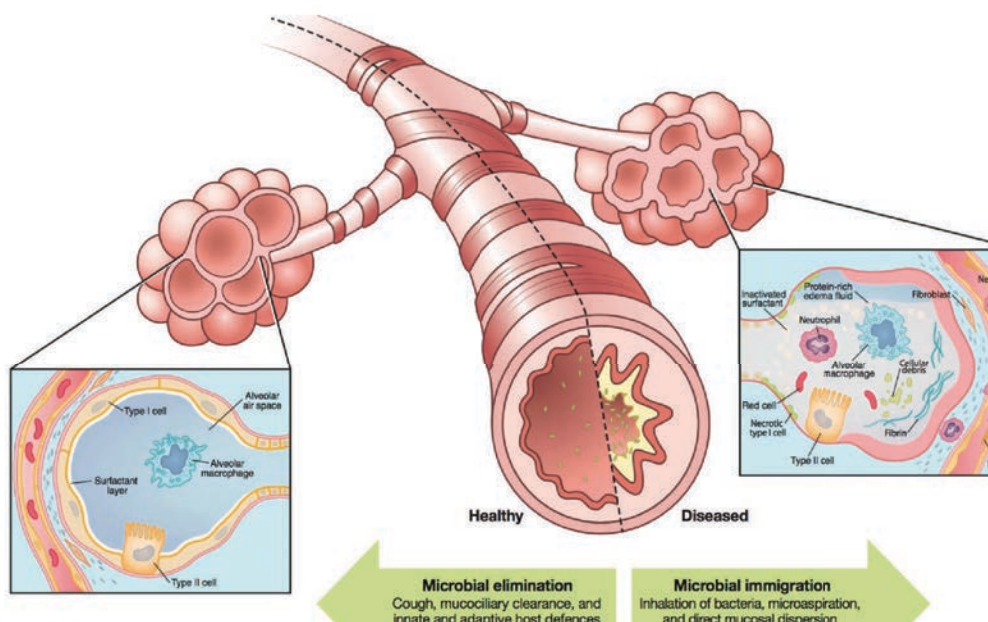
Chez la souris, la formation du microbiote des voies respiratoires se fait de manière concomitante aux étapes de maturation immunitaire, établissant, alors, le développement d'une tolérance aux allergènes inhalés (395).

Des altérations du nombre et/ou de la diversité du microbiote sont constatées dans la composition du microbiote de poumons malade (414-416).



**tractus respiratoires et celui du tractus digestif**

Comparaison de l'anatomie et des microbiotes bactériens des régions supérieures des voies aérodigestives chez l'homme. La composition bactérienne est montrée au niveau du phylum. Les gammaprotéobactéries sont une classe du phylum des protéobactéries. Les flèches représentent le flux d'air provenant de la cavité buccale. (1)



Représentation de l'environnement, du microbiote, de la structure anatomique et des mécanismes immunologiques contrôlant la composition du microbiote pulmonaire chez l'homme. (1)



## **D - DYSBIOSE – MICI ET PATHOLOGIES RESPIRATOIRES**

Des perturbations dans la composition du microbiote intestinal dérèglent le développement de réponses immunitaires locales et systémiques (421) avec des conséquences extra-intestinales notamment au niveau pulmonaire sur les pathologies inflammatoires chroniques que sont l'asthme et la BPCO (422, 423). Aujourd'hui, il est admis que la moitié des cas de patients atteints de RCH (402) ou de MC (424) présente des anomalies pulmonaires car même s'il y a une absence de symptômes broncho-alvéolaires ou d'altération de la fonction pulmonaire, il existe une inflammation de type bas grade dans les voies respiratoires (425).

Cette démonstration d'un retentissement d'une dysbiose intestinale sur le poumon a été difficile à établir et a fait l'objet de controverses (426) . Les patients atteints de MICI, initialement asymptomatiques, présentaient un large spectre de symptômes pulmonaires accompagné d'un large éventail d'atteinte pulmonaire apparaissant par la suite. Des altérations fonctionnelles ont été observées non seulement dans les grandes mais également dans les petites voies respiratoires. Des modifications de l'épithélium bronchique comme de l'hyperplasie cellulaire, l'épaississement de la membrane basale, une inflammation de la sous-muqueuse, une fibrose des petites voies aériennes et une augmentation de l'épaisseur épithéliale, ainsi que l'inflammation du parenchyme pulmonaire sont observées. Les symptômes se manifestent avec notamment l'augmentation du nombre de lymphocytes alvéolaires, une réduction de la capacité de diffusion du poumon.

Il a été estimé dans une étude qu'environ 48 % des patients adultes atteints de MICI et 71 % des enfants et adolescents atteints de MICI ont une hyperréactivité bronchique (427, 428). Dans une étude canadienne réalisée sur une grande population, des complications pulmonaires ont été recensées comme troubles chroniques concomitants chez les patients présentant une MICI. L'atteinte pulmonaire était d'ailleurs plus forte chez les patients avec une maladie prononcée par rapport aux personnes en rémission. Une méta-analyse a montré que dans 39 % des cas de patients atteints de MICI, des altérations fonctionnelles des voies respiratoires étaient également observés (429). Une cohorte effectuée sur la population de Taïwan (n = 26 300) montre, à son tour, que les MICI sont associées à une forte probabilité de développer de l'asthme (430). La déficience pulmonaire observée, ne l'est pas uniquement chez les adultes mais aussi chez les enfants présentant une maladie intestinale.

## **E - PERTURBATIONS DE L'AXE POUMON-INTESTIN AU COURS DE LA DYSBIOSE**

L'homéostasie immunitaire repose sur l'équilibre du microbiote permettant d'assurer le développement, l'ancrage et la maturation du système immunitaire.

Chez l'espèce humaine, des facteurs comme les facteurs environnementaux, l'alimentation, les traitements antibiotiques, le stress, etc, peuvent altérer cet équilibre et induire une diminution d'expression de certaines espèces bactériennes commensales, entraînant alors la croissance d'espèces pathogènes (431). Cette dysbiose impacte les tissus et l'homéostasie immunitaire intestinale mais a aussi des conséquences extra-intestinales (94).

L'axe poumon-intestin doit être vu comme un axe bidirectionnel pouvant être régulé, activé et stimulé par les changements de l'immunité intestinale et/ou pulmonaire (114, 391). En effet, outre des retentissements de maladies intestinales sur l'homéostasie pulmonaire, une communication en sens inverse se produit également. Des troubles pulmonaires chronique comme l'asthme, la MPOC et la Fibrose Kystique (FK) présentant une dysbiose pulmonaire, sont également associés à des perturbations gastro-intestinales comme le SII (432). Chez la souris, il a été observé que des infections respiratoires comme la grippe, peuvent induire, de manière indirecte, des lésions immunitaires intestinales et altérer le microbiote intestinal avec notamment une dysbiose intestinale caractérisée par la croissance des entérobactéries, la diminution des lactobacilles et des lactocoques (433).

La dysbiose du microbiote pulmonaire murin apparaissant suite à une administration de lipopolysaccharide (LPS), s'accompagne de modifications du microbiote intestinal, et ce notamment en raison du mouvement des bactéries pulmonaires vers la circulation sanguine (434). Cette dysbiose pourrait être due à l'interaction entre les cellules immunitaires pulmonaires transloquées et le microbiote intestinal.

En outre, plusieurs études établies sur différents modèles animaux ont démontré que la pneumonie due à l'infection par plusieurs *Staphylococcus aureus* et étant résistant aux médicaments ou par *Pseudomonas aeruginosa*, est susceptible d'induire des lésions intestinales (435). En effet, la pneumonie causée par *P. aeruginosa* entraîne une réduction de la prolifération épithéliale intestinale et bloque la phase M du cycle cellulaire (436).

## **F - MODULATION IMMUNE DU TUBE INTESTINAL ET DES VOIES AÉRIENNES**

### **a - par les acides gras à courtes chaînes**

La compréhension des mécanismes par lesquels l'intestin impactent la physiologie pulmonaire et vice versa ne fait que commencer (89). Il existe certains facteurs qui exercent leurs fonctions le long de l'axe poumon-intestin, comme la dissémination systémique des composants d'origine bactérienne et la dégradation des produits métaboliques. Les AGCC, produits métaboliques des bactéries commensales intestinales, sont considérés comme les immunomodulateurs les plus importants impliqués dans le dialogue intestin-poumon. Ils sont produits localement dans l'intestin, mais sont également retrouvés de manière périphérique au TGI ce qui permet le maintien et le renforcement de l'intégrité épithéliale intestinale et module l'inflammation dans l'intestin et les voies respiratoires (109).

L'effet direct le plus important de ces métabolites sur les fonctions immunitaires à lieu via les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), exprimés par plusieurs types cellulaires (437). La signalisation des AGCC peut entraîner différents effets sur les fonctions cellulaires et impliquer différentes voies comme i) l'activation de MAP (protéines kinases activées par des mitogènes) (MAP), par la phosphoinositide 3 (PI3K)-kinases et par le mammalian target of rapamycin (mTOR) aboutissant à un effet inflammatoire, ii) l'implication des  $\beta$ -arrestines intracellulaires (396, 438), iii) l'inhibition de l'activité de l'histone désacétylase (HDAC) dans divers types cellulaires conduisant à moduler les réponses immunitaires (397).

Ainsi, les AGCC possèdent des fonctions pléiotropes dans divers types cellulaires et tissulaires. Leur activité dépend non seulement de leur disponibilité relative et de l'affinité existante pour les récepteurs, mais aussi de l'expression des GPCR, de la disponibilité des molécules de transport et des molécules effectrices dans les divers types cellulaires (437).

### **b - par l'activation de population cellulaire spécifique**

La tomodensitométrie haute résolution (HRCT) a démontré qu'il existe **plusieurs centres de réponses des voies respiratoires**. En effet, lorsque l'épithélium respiratoire des voies aériennes est affecté les cellules épithéliales sont alors considérées comme la cible principale de l'inflammation. Après activation, les cellules vont libérer de grandes quantités de médiateurs pro-inflammatoires attirant, alors, les cellules inflammatoires.

Dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et les expectorations des patients atteints de MICI, une augmentation de certaines populations cellulaires immunitaires comme les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules T a été observée.

### **c - par un mauvais « homing »**

Un « mauvais homing » des lymphocytes intestinaux et/ou pulmonaires est un autre mécanisme connu pouvant modifier et altérer le bon fonctionnement de l'axe poumon-intestin contribuant ainsi à l'étiologie des maladies inflammatoires mucoales.

Lors d'un état physiologique sain, non enflammé, les lymphocytes vont migrer préférentiellement vers le tissu où ils ont rencontré l'antigène pour la première fois (229). Cependant, les lymphocytes intestinaux des patients atteints de MICI sont connus pour manquer de spécificité tissulaire (439). Cette lacune peut expliquer la présence de l'inflammation dans de nombreux organes, autre que l'intestin, chez ces patients. Les pathologies, pulmonaires ou intestinales, se trouvant être à médiation lymphocytaire lors d'une MICI, peuvent, donc, être le résultat d'un homing non spécifique de ces cellules.

Cet homing peut passer par une voie spécifique pour la migration cellulaire chez la souris comme l'ont montré Ruane et collaborateurs. Les cellules dendritiques intestinales et pulmonaires peuvent réguler de manière positive la production de molécules d'autoguidage spécifiques à l'intestin (comme l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et la chimiokine (CCR9)) et peuvent recruter des cellules T intestinales spécifiques à l'antigène (440).

### **d - par l'activation de récepteurs immunitaires spécifiques**

L'immunité pulmonaire est également permise par la présence et l'existence de récepteurs du système immunitaire inné, récepteurs de type TLR impliqués dans la reconnaissance de motifs microbiens déclenchant l'activation de la transcription du facteur NF $\kappa$ B nécessaire à l'expression des gènes impliqués dans l'immunité innée et l'inflammation (cf chapitre système immunitaire intestinal). La signalisation normale de ces TLR fait intervenir le microbiote. Il a été démontré que l'origine intestinale de la signalisation de type TLR peut induire des réponses inflammatoires dans le poumon. De plus, une injection intestinale de ligands aux TLR peut pleinement restaurer la fonction pulmonaire des souris germ-free (92).



A contrario, la possible restauration de la fonction intestinale obtenue après une injection de ligands TLR dans les poumons reste encore actuellement méconnue.

### **e - autres facteurs potentiels**

Les pathologies respiratoires et intestinales partagent de nombreuses caractéristiques qui leurs sont communes comme leur caractère inflammatoire, permettant d'envisager la possibilité que la ou les mêmes molécules responsables de ces altérations soient présentes dans les deux tissus. Le **tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT) régule le trafic des lymphocytes du tissu pulmonaire. Le GALT (tissu lymphoïde associé à l'intestin) transporte, quant à lui, les lymphocytes de l'intestin.** La littérature scientifique actuelle ne permet pas d'établir la présence et l'identification d'un médiateur unique, d'un allergène ou d'une enzyme spécifique comme élément de liaison entre l'intestin et les poumons (ou tout autre organes).

Cependant, des études démontrent que **la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP)** pourrait jouer un rôle dans l'établissement de ce lien. La TSLP est un facteur reliant les réponses présentes au niveau de l'interface entre le corps et l'environnement (muqueuses, peau et le tissu oculaire) aux réponses allergiques induites par les cellules de type Th2 (Liu, 2006). Il intervient dans la régulation de l'inflammation de la peau et des voies respiratoires. Dernièrement il a été démontré que la TSLP est aussi constitutivement exprimée par les cellules épithéliales intestinales de sujets sains (niveau le plus élevé de l'épithélium colique), où elle semblerait être impliquée dans la tolérance au microbiote commensal par sa modulation des fonctions des CD (441). Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, une rupture de cet équilibre est observée. La production de cytokines de type Th2, la production d'IgE et l'apparition des allergies médiées par les cellules Th2 sont alors induites dans le poumon et le tractus gastrointestinal (425, 442).

En plus du TSLP, certains facteurs de croissance, comme le facteur vasculaire de croissance endothélial (VEGF), et certaines cytokines comme TGF-bêta, TNF, IL-6 et IL-13, peuvent être des molécules également importantes dans l'établissement, l'existence et le maintien de cet axe poumon-intestin. En effet, toutes ces cytokines sont fortement impliquées dans les MICI et les maladies respiratoires (443, 444).

**Le facteur VEGF** est connu pour son implication dans la pathogenèse des MICI (443). Au niveau pulmonaire ; il favorise également l'angiogenèse pulmonaire, l'extravasation leucocytaire, l'inflammation et la diminution de la fonction de la barrière endothéliale pulmonaire.

**L'IL-6 et TGF $\beta$** , sont des déclencheurs majeurs du développement de cellules T de type **Th17** entraînant une inflammation spécifique dans différents organes (444).

Enfin, les **protéases** sont également à prendre en compte dans la pathogenèse de cet axe poumon-intestin (445).

L'augmentation de l'activité des enzymes protéasiques entraîne une mauvaise fonctionnalité de la barrière épithéliale et une inflammation excessive. Cette augmentation de l'activité des protéases est à la fois retrouvée dans la MPOC (maladie pulmonaire obstructive chronique) et les MICI. Il a également été démontré l'existence et la présence d'une autre protéase dans l'intestin humain, la **Der p 1, Dermatophagoides Pteronyssinus**, (un antigène respiratoire environnemental ubiquitaire d'acarien de la poussière de maison) (446).

Cette dernière a des effets néfastes sur l'intestin sain et peut déclencher de l'inflammation dans des sites éloignés (cf plus haut).

Les perturbations du microbiote intestinal ou du microbiote pulmonaire (dysbiose), induites par des agressions alimentaires, pathologiques ou physiques (telles que l'exposition aux toxines et à la fumée de cigarette), entraînent la présence d'une immunité innée inappropriée, une augmentation de l'inflammation et la perte ou le déséquilibre des métabolites bactériens.

## OBJECTIFS

désordres intestinaux. Ces liens mettent en évidence l'existence d'un axe poumon-intestin validant et établissant les effets mutuels observés lors d'une altération de la physiologie de chacun de ces deux organes. Les quelques études expérimentales chez l'animal ont montré qu'une exposition aux particules de l'air ambiant pouvait induire une inflammation chez la souris adulte Vignal and al, (21). Et qu'elle pouvait aussi altérer et augmenter la colite initialement induite expérimentalement. Cependant les mécanismes sous-jacents restent encore mal connus.

Les travaux de cette thèse ont été entrepris afin d'aller plus loin dans **la caractérisation des effets des polluants inhalés sur l'homéostasie intestinale en utilisant le modèle souris.**

Des travaux préliminaires menés dans le cadre de cette thèse ont confirmé que l'inhalation de particules de l'air ambiant produit une modulation de l'inflammation intestinale chez la souris adulte (21). Fort de ces données, il est apparu essentiel de poursuivre l'étude des effets de la pollution atmosphérique sur le système intestinal murin en considérant deux contextes d'exposition distincts à la fois par la nature des atmosphères étudiées et par la population cible.

Ces deux contextes qui seront présentés successivement dans ce manuscrit sont :

- 1- Effets de l'inhalation d'un mélange de nanoparticules manufacturées sur l'inflammation intestinale et le microbiote chez la souris adulte saine ou présentant une colite induite.**

Nous nous sommes intéressés à une pollution particulaire émergente, celle liée à la présence accrue des nanoparticules manufacturées dans les environnements intérieurs. Au démarrage de cette thèse, très peu de travaux étudiant la toxicité intestinale de ces nanoparticules via la voie respiratoire et d'études associant un mélange réaliste de NP existaient. Suite à la documentation et au recensement effectué par Hansel et son équipe, une liste des principaux constituants des nanomatériaux retrouvés sur le marché européen a été établit. Les principales nanoparticules manufacturées retrouvées dans l'atmosphère et auxquelles la

population générale est la plus exposée par inhalation sont l'Argent, le Dioxyde de Titane, le Titane et le Dioxyde de Silice (4)

Des souris adultes mâles et femelles, physiologiquement saines ont été exposées durant 28 jours au cocktail de NPs. L'évaluation de l'inflammation intestinale a été effectuée par une analyse histologique (détermination d'un score d'infiltrat inflammatoire), et moléculaire (étude de l'expression des transcrits de différents marqueurs inflammatoires), afin de caractériser le type de réponse immunitaire induite. Une analyse du microbiote intestinal a également été effectuée. L'expérience a été reproduite en utilisant des souris mâles et femelles, présentant une colite induite chimiquement, par une administration de Dextran Sodium Sulfate à 2% dans leur eau de boisson, sur les sept derniers jours d'exposition au cocktail de nanoparticules, afin d'observer si une exposition préliminaire à ce type de pollution pouvait aggraver la colite induite.

## **2- Effets d'une exposition in utero à une pollution atmosphérique simulée sur le développement intestinal**

Nous nous sommes ici intéressés à une pollution de l'air ambiant reproduisant toute sa complexité en associant à la fois la composante gazeuse et particulaire. La mise en place de type d'étude est rare car elle nécessite d'être capable de générer et maintenir dans la durée une atmosphère complexe. Nous avons pu bénéficier des installations de la plateforme Sésame dans laquelle les chimistes des aérosols du LISA peuvent simuler et contrôler des atmosphères complexes dans une chambre atmosphérique qui est adossée à un incubateur permettant l'exposition des animaux à un air entièrement contrôlé (447). Nous avons choisi d'exposer nos animaux à une atmosphère simulant celle particulièrement contaminée qui se produit fréquemment à Pékin. La seconde originalité de cette étude a été d'exposer des femelles gestantes afin d'investiguer les impacts potentiels sur la descendance au niveau intestinal. En effet, il y a de plus en plus de travaux qui suggèrent qu'une exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique induit des altérations des systèmes respiratoires, cardio-vasculaires voire métaboliques de l'enfant, exposé *in utero* (356, 360). A ce jour l'impact d'une exposition gestationnelle sur le système intestinal n'a pas été investigué justifiant de tester cette hypothèse lors de ce travail de thèse.

Les souris gestantes ont été exposées par inhalation corps entier dans une enceinte de ventilation du 10<sup>ème</sup> au 17<sup>ème</sup> jour de gestation qui correspondent au développement intestinal. Les tissus intestinaux des souriceaux de 17 jours (colon proximal, iléon et caecum) ont été récupérés pour une analyse moléculaire et histologique de la maturation, la différenciation, la prolifération et de l'inflammation intestinale. Le microbiote intestinal de ces souriceaux a également été analysé afin d'observer si une éventuelle dysbiose était induite.



# PARTIE II - RESULTATS





## Effet de l'exposition par inhalation d'un cocktail de nanoparticules manufacturées sur l'homéostasie intestinale de la souris

Dans cette première étude, nous nous sommes intéressés aux effets de l'inhalation de nanoparticules. La production de nanomatériaux croît exponentiellement et leur présence dans notre environnement, pose le problème de l'exposition humaine notamment en milieu intérieur et/ou professionnel. Les études expérimentales suggèrent que certaines nanoparticules manufacturées puissent avoir un effet néfaste pour la santé animale (240). Les mécanismes de toxicité impliquent notamment l'induction d'un stress oxydatif mais aussi, pour les nanoparticules inhalées, des défauts de clairance par les macrophages alvéolaires. Ceci favorise la translocation de la barrière air-sang et un passage systémique qui peut aboutir à des effets sur des organes extra-pulmonaires tels que l'intestin.

Jusqu'à présent les études toxicologiques investiguant l'impact des nanoparticules sur le système digestif se sont principalement intéressées à une exposition par la voie orale et en étudiant chaque type de nanoparticules individuellement. La particularité de notre étude a été d'une part de tester l'hypothèse d'un effet des nanoparticules sur l'homéostasie intestinale lorsque l'exposition se fait par la voie respiratoire et d'autre part d'utiliser un mélange de nanoparticules. Notre choix s'est porté sur l'argent, le titane, le dioxyde de titane et le dioxyde de silice en se basant sur la publication d'Hansen et son équipe, qui a montré qu'elles étaient les principales nanoparticules manufacturées retrouvées dans l'air (4).

L'objectif de de premier axe de la thèse a été d'étudier **l'impact d'une exposition subaigüe par inhalation à un mélange de nanoparticules manufacturées (Ag, Ti, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) présentes dans l'air, sur des souris adultes saines ou bien ayant une colite**. Nous avons fait le choix d'une exposition par inhalation corps entier et en condition d'exposition répétée (28 jours). L'étude a été réalisée sur des souris saines mais également sur des souris chez lesquelles on a induit une colite (par administration d'une eau de boisson présentant 2% de Dextran Sodium Sulfate) pour déterminer si cette condition pathologique conduit à une exacerbation des effets inflammatoires. Par ailleurs pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes, quelques expériences ont été réalisées en exposant directement des organoïdes intestinaux au mélange de nanoparticules.

Ces résultats sont présentés sous la forme d'une publication actuellement acceptée avec des corrections mineures au sein du journal « *Ecotoxicology and Environmental Safety* ».

### **MATERIEL ET METHODES :**

Des souris mâles C57BL/6 âgées de 7 semaines ont été exposées par inhalation à un cocktail de nanoparticules manufacturées ou à une solution d'eau contrôle, 4 heures par jour durant 28 jours.

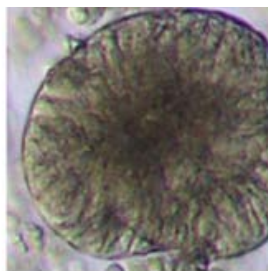
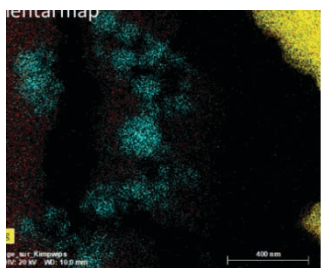
Le cocktail de nanoparticules contient 1,1 mg/m<sup>3</sup> de chacune des nanoparticules. Cette dose est basée sur l'OEL (Occupational Exposure Limite dose) du TiO<sub>2</sub> (448, 449) qui est la seule réglementation existante concernant les nanoparticules manufacturées. Une chambre d'inhalation permettant de créer un aérosol par nébulisation a été utilisée. Un travail en collaboration a permis de caractériser les nanoparticules individuellement et de les observer par TEM (microscopie électronique à transmission) lorsqu'elles sont en cocktail (travail en collaboration avec l'unité CNRS UMR 8516 - LASIRE - Laboratoire de Spectroscopie pour les Interactions, la Réactivité et l'Environnement de Lille et EA 4493 – LPCA - Laboratoire de Physico-Chimie de l'Atmosphère de Dunkerque).

Après cette exposition, le tractus digestif entier (colon proximal et distal, iléon, jéjunum et duodénum) a été prélevés. Le niveau d'expression d'ARNm de certains marqueurs inflammatoires (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL17a, IL22, IL10 et Cxcl10) a été quantifié par RT-qPCR dans les organes. Suite aux résultats obtenus par cette analyse en RT-qPCR, seuls les parties distales et proximales du colon, ainsi que le jéjunum présentaient des variations de l'expression de ces gènes. Une analyse histologique par un scoring de l'infiltrat inflammatoire a été effectuée après une coloration May-Grünwald Giemsa sur ces trois segments. La composition du microbiote intestinal a également été analysée et après récupération du contenu caecal des souris mâles et femelles, en collaboration avec une équipe de l'unité UMR2014 - US41 – PLBS (Plateformes Lilloises de Biologie & Santé) de l'institut Pasteur de Lille.

Pour l'étude de la caractérisation de la réponse immunitaire du tube digestif suite à l'inhalation de ce cocktail de nanoparticules en conditions pathologiques, une colite a été chimiquement induite. Pour cela, des souris mâles femelles C57/Bl6 ont été exposées pendant 28 jours au cocktail de nanoparticules et une colite a été induite expérimentalement lors des 6 derniers jours d'exposition aux nanoparticules, en administrant de l'eau de boisson du DSS2% (Dextran Sodium Sulfate). Les données cliniques comme le suivi de la perte de poids, le ratio poids/taille du colon ont été relevés afin d'établir si une exposition concomitante à l'induction d'une colite aggravait les principaux symptômes de cette dernière. Le niveau d'expression d'ARNm de certains marqueurs inflammatoires (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$  et Cxcl10) a été quantifié par RT-qPCR dans les organes. Une analyse histologique a été effectuée après une coloration May-Grünwald Giemsa et une détermination de la sévérité du score inflammatoire a été effectuée.

Un modèle *in vitro* a été utilisé pour une étude de la cytotoxicité et de l'inflammation en utilisant des organoïdes intestinaux inversés c'est-à-dire dont le pôle apical est tourné vers l'extérieur. Ceci permet de mimer le contact direct des nanoparticules avec les cellules tel qu'il se produit lors d'une exposition par ingestion ou par inhalation (secondairement à la clairance mucociliaire). Les organoïdes ont été exposés à 0,02 ; 0,2 et 2  $\mu$ M de nanoparticules testées ici séparément. Les concentrations ont été sélectionnées en se basant sur l'étude de Park and al 2020 (450) et en s'ajustant à la plus petite concentration inhibitrice médiane (IC50) retrouvée. La cytotoxicité a été évaluée directement après les 24 heures de traitement aux différentes concentrations par un dosage de la LDH) et l'inflammation, par quantification par RT-qPCR du niveau d'expression d'ARNm de certains marqueurs inflammatoires et des alarmines sécrétées par les cellules épithéliales (TNF $\alpha$ , IL1a, IL33, IL6, Ccl5, Ccl20, Cxcl1 et Cxcl10).

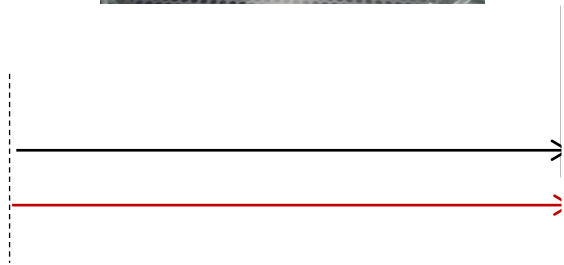
L'exposition au cocktail de NP induit une microinflammation chez le mâle sain, modifie le microbiote intestinal des deux sexes, et aggrave la colite initialement présente chez la femelle. Cette exposition aggrave l'inflammation présente et induite par l'administration de DSS 2%. Enfin, les nanoparticules présentent chacune des effets lors des tests *in vitro* individualisés.



**ANALYSE DES NANOPARTICULES INDIVIDUELLEMENT**

24 heures ; 0,02 – 0,2 – 2 μM :

- Analyse de la cytotoxicité
- Quantification des marqueurs inflammatoires et alarmines



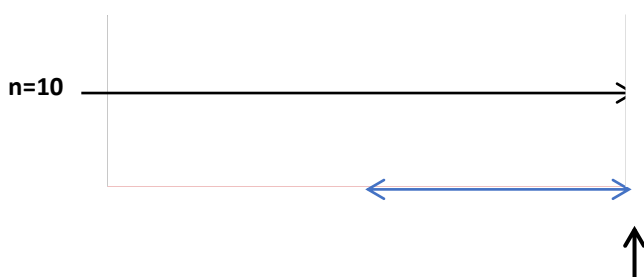
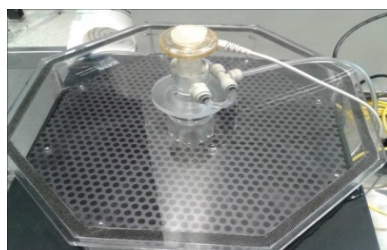
ANALYSE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE INTESTINALE

inflammatoires (qPCR)

**D**



C57 BL/6 : mâles, femelles  
Colite induite expérimentalement



ANALYSE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE INTESTINALE

Analyse histologique

**chez l'animal ou traitement d'organoïdes intestinaux**

Observation du cocktail des nanoparticules manufacturées par TEM (A)

Protocole pour l'étude des effets cytotoxiques et inflammatoires des nanoparticules individuelles sur des organoïdes intestinaux murins (B)

Protocole expérimental pour l'étude des effets d'une inhalation à un cocktail de nanoparticules manufacturées (Ag, Ti, TiO2, SiO2) (C) et en conditions d'induction expérimentale d'une colite par administration de DSS (D)

(ENC, n= 10 ; CT, n=10) ENC : Engineered Nanoparticles Cocktail ; CT : Control

1 **Title page**

2 **Title**

3 Exposure to atmospheric Ag, TiO<sub>2</sub>, Ti and SiO<sub>2</sub> engineered nanoparticles modulates gut  
4 inflammatory response and microbiota in mice

5 **Author names and affiliations**

6 Eva Guilloteau<sup>1</sup>, Madjid Djouina<sup>1</sup>, Ségolène Caboche<sup>2</sup>, Christophe Waxin<sup>1</sup>, Karine Deboudt<sup>3</sup>,  
7 Delphine Beury<sup>2</sup>, David Hot<sup>2</sup>, Muriel Pichavant<sup>5</sup>, Laurent Dubuquoy<sup>1</sup>, David Launay<sup>1</sup>, Cécile  
8 Vignal<sup>1</sup>, Marie Choël<sup>4</sup>, Mathilde Body-Malapel<sup>1</sup>

9 1. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286- INFINITE - Institute for Translational Research in  
10 Inflammation, F-59000, Lille, France

11 2. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR2014 - US41 - PLBS-  
12 Plateformes Lilloises de Biologie & Santé, F-59000, Lille, France

13 3. Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 4493 – LPCA - Laboratoire de Physico-Chimie de  
14 l'Atmosphère, 59140, Dunkerque, France

15 4. Univ. Lille, CNRS, UMR 8516 - LASIRE - Laboratoire de Spectroscopie pour les  
16 Interactions, la Réactivité et l'Environnement, F-59000, Lille, France

17 5. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CHIL  
18 - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000, Lille, France

19 **Corresponding author**

20 Mathilde BODY-MALAPEL, PhD

21 E-mail address:

22 mathilde.body@univ-lille.fr

23 Full postal address: Institute for Translational Research in Inflammation

24 Infinite - Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286

25 Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 4ème étage Centre, Place Verdun, F-59045, Lille, Cedex

26 **Abstract**

27 The development of nanotechnologies is leading to greater abundance of engineered  
28 nanoparticles (EN) in the environment, including in the air we breathe. To date, it has been  
29 shown that the most prevalent EN found in the air are silver (Ag), titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>),  
30 titanium (Ti), and silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>). As the intestinal tract is increasingly recognized as a  
31 target for adverse effects induced by inhalation of air particles, the aim of this study was to  
32 assess the impact of these 4 atmospheric EN on intestinal inflammation and microbiota. We  
33 assessed the combined toxicity effects of Ag, Ti, TiO<sub>2</sub>, and SiO<sub>2</sub> following a 28-day inhalation  
34 protocol in male and female mice. In distal and proximal colon, and in jejunum, EN mixture  
35 inhalation did not induce overt histological damage, but led to a significant modulation of  
36 inflammatory cytokine transcript abundance, including downregulation of *Tnfα*, *Ifnγ*, *Il1β*,  
37 *Il17a*, *Il22*, *Il10*, and *Cxcl1* mRNA levels in male jejunum. A dysbiosis was observed in cecal  
38 microbiota of male and female mice exposed to the EN mixture, characterized by sex-dependent  
39 modulations of specific bacterial taxa, as well as sex-independent decreased abundance of the  
40 *Eggerthellaceae* family. Under dextran sodium sulfate-induced inflammatory conditions,  
41 exposure to the EN mixture increased the development of colitis in both male and female mice.  
42 Moreover, the direct dose-response effects of individual EN on gut organoids was studied and  
43 Ag, TiO<sub>2</sub>, Ti, and SiO<sub>2</sub> were found to generate specific inflammatory responses in the intestinal  
44 epithelium. These results indicate that the 4 most prevalent atmospheric EN could have the  
45 ability to disturb intestinal homeostasis through direct modulation of cytokine expression in gut  
46 epithelium, and by altering the inflammatory response and microbiota composition following  
47 inhalation.

48

49 **Keywords:** Engineered Nanoparticles. Inhalation. Inflammation. Colitis. Organoid. Mixture.

50



## 51 1. Introduction

52

53 The International Organization for Standardization defines a nanoparticle as a nanomaterial  
54 with all three dimensions in the nanoscale, which is approximatively 1 to 100 nm (Boverhof et  
55 al., 2013). Nanoparticles that are synthesized artificially for commercial use are called  
56 engineered nanoparticles (EN) (Prajitha et al., 2019). EN are prepared deliberately at the  
57 nanoscale because they exhibit properties that provide technological advantages compared with  
58 the bulk form of the same material (The Royal Society and The Royal Academy of Engineering,  
59 2004). EN usage is widespread, covering the energy sector, telecommunications industry,  
60 computing, agrichemicals (nanopesticides and nanofertilizers), and personal care products  
61 (Hansen et al., 2016). Nanotechnologies have also provided new opportunities in medicine  
62 mainly through the use of EN for diagnostic and therapeutic purposes (biomedical imaging,  
63 drug delivery, and targeting) (Rudramurthy and Swamy, 2018). Nanotechnology has become a  
64 critical component in the modern world and the global nanotechnology market is expected to  
65 exceed USD \$125 billion by 2024 (Inshakova et al., 2020). In everyday life, humans are  
66 exposed to thousands of nanoparticles via dermal contact, inhalation, and ingestion (including  
67 parenteral administration) (Malakar et al., 2021). Although advances in the field of  
68 nanotechnology have resulted in a myriad of possibilities for technological improvement, the  
69 introduction of a wide range of novel EN to the environment and to humans, either by design  
70 or inadvertently, raises the possibility of harmful and/or unforeseen adverse effects. Indeed,  
71 inhalable nanoparticles can be transported in blood and the lymphatic system and bypass  
72 barriers within the body which are generally impermeable to larger particles (Bakand et al.,  
73 2012). Especially noteworthy, studies have highlighted that ambient particulate matter (PM)  
74 exerts a deleterious impact on the intestinal tract of mice. Ambient ultrafine PM is similar in  
75 size to EN, but it is derived from natural and combustion processes. It has been shown in mice

3

76 that inhalation of ambient ultrafine PM shortened villus length and infiltrated macrophages and  
77 neutrophils in the small intestine (Li et al., 2015). Moreover, another study in mice showed that  
78 ambient ultrafine PM inhalation led to epithelial injury with inflammatory cell infiltration and  
79 mucus depletion in the colon (X. Li et al., 2019). Regarding EN, toxicological studies have  
80 highlighted organ-specific toxicity of various nanoparticles following inhalation (Hadrup et al.,  
81 2020; Kim et al., 2018; Murugadoss et al., 2017; Sutunkova et al., 2020), but the impact of EN  
82 inhalation on the intestine has never been explored.

83 In this study, we focused on the most abundant EN found in air. Despite the general lack of  
84 qualitative and quantitative data on human exposure to EN, Hansen et al. have established The  
85 Nanodatabase (<http://www.nanodb.dk>), which is an online inventory of products claimed by  
86 manufacturers to contain nanomaterials or include nanotechnology. This database indicates that  
87 for inhalation, silver (Ag) is the most prevalent nanomaterial followed by titanium (Ti), titanium  
88 dioxide (TiO<sub>2</sub>), and silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>) (Hansen et al., 2016). Ag and Ti nanoparticles are  
89 known for their biological and biomedical properties (Pereira et al., 2018). Both are often  
90 present in consumer products such as cosmetics, food additives, kitchen utensils, and toys. Ag  
91 nanoparticles exhibit antimicrobial activity and are used in the areas of food preservation,  
92 personal care products (shampoos, lotions, and toothpaste), spray disinfectants, antibacterial  
93 surfaces and textiles, nanomedicine, and dentistry (Lee and Jun, 2019; Rogers et al., 2018; Tang  
94 and Zheng, 2018; Yin et al., 2020). Ti is employed within artificial implants in dental and  
95 orthopaedic surgery (Chouirfa et al., 2019). SiO<sub>2</sub> (including synthetic amorphous silica, or SAS)  
96 and TiO<sub>2</sub> are produced in high volumes and applied in many consumer and food products. SiO<sub>2</sub>  
97 nanoparticles are used as food additive (E551) to prevent poor flow or caking particularly in  
98 powdered products. TiO<sub>2</sub> nanoparticles are extensively used as a pigment, a thickener, and an  
99 ultraviolet absorber in cosmetic and skin care products. TiO<sub>2</sub> allows osseointegration of  
100 artificial medical implants and bone (Gupta and Xie, 2018). In addition, TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> are used



101 in protective coatings and for environmental treatment to protect products against  
102 environmental damage or to treat air and water in the home. Both have been found in human  
103 tissues including jejunum and ileum (Peters et al., 2020). The aim of this study was to determine  
104 if the presence of these 4 EN in ambient air can result in intestinal adverse health effects. For  
105 this purpose, mice were exposed by inhalation to a mixture of Ag, Ti, TiO<sub>2</sub>, and SiO<sub>2</sub>  
106 nanoparticles for 28 days, and the impact on intestinal tissues was analysed at steady-state and  
107 in the context of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis, a model commonly used to  
108 mimic acute intestinal inflammation in mice. Moreover, the effects of individual Ag, Ti, TiO<sub>2</sub>,  
109 and SiO<sub>2</sub> EN were studied in intestinal organoids, the most advanced *in vitro* model for gut  
110 epithelium characterization.

111

## 112 2. Materials and methods

113

### 114 2.1. Characterization of EN by transmission electron microscopy (TEM)

115 SiO<sub>2</sub> in water (average particle size (APS) 20 nm), TiO<sub>2</sub> (anatase; APS 5-30 nm) in water, Ti  
116 powder (APS 60-80 nm), and Ag powder (APS 50-60 nm) were purchased from IoLiTec  
117 Nanomaterials. For physicochemical characterization, each nanoparticle sample was diluted in  
118 ultrapure water and deposited on TEM grids (Copper 200 mesh grids with carbon film, Agar  
119 Scientific<sup>TM</sup>). Once dried, each sample was observed by scanning electron microscopy (FEG-  
120 SEM), using a JEOL<sup>TM</sup> JSM7100F electron microscope equipped with a transmitted electron  
121 detector and 3 X-ray energy dispersive spectrometers (Bruker<sup>TM</sup> XFlash 6/30), enabling the  
122 analysis of elements with atomic numbers greater than boron ( $Z \geq 5$ ). The microscope was  
123 operated at 15 kV with a probe current of 300 pA and a working distance suitable for X-ray  
124 detection (10 mm). All nanoparticle suspensions were used within 1 h after sonication.

125

**126 2.2. Animals and experimental design**

127 The animal protocol was approved by the regional bioethics committee (committee no.75;  
128 authorization no. CEEA 2016072517274040) and the animals received human care in  
129 accordance with the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals (National Research  
130 Council (US) Committee, 2011). Male and female C57BL/6 mice (aged 7 weeks) were  
131 purchased from Janvier Labs and housed under standard conventional conditions (Suppl. Fig.  
132 1A). The room relative humidity was 55% and the temperature was 21°C. Mice were randomly  
133 divided into the different exposure groups (n=10/group). Mice were placed 4 h/day, 5  
134 days/week for 28 days in a ventilated whole-body inhalation chamber that allowed free  
135 movement (inExpose, SCIREQ Scientific®). Nebulization was achieved using an Aeronex  
136 Lab™ ultrasonic nebulizer directly connected to a 5 L chamber and controlled through  
137 flexiWare software v.6 according to the following parameters: bias flow of 2 L/min and  
138 nebulization rate of 0.083 ml/min, which we measured and controlled throughout the  
139 experiment. These parameters allowed the nebulization of the EN mixture at a concentration of  
140 1 mg/m<sup>3</sup> in the chamber. Mice were euthanized the morning following the final exposure day.  
141 The distal colon, proximal colon, and jejunum were collected and stored for subsequent  
142 analyses.

143

**144 2.3. Gut histological analysis**

145 Formaldehyde-fixed intestinal tissues were embedded in paraffin, serially sectioned (4 µm),  
146 and stained with May-Grünwald and Giemsa (MGG). An inflammatory infiltration score was  
147 blindly determined according to Li et al. (X. Li et al., 2019). This score is the sum of the  
148 infiltration score plus the percent area involved of each section. Infiltration was scored on a  
149 scale of 0 to 3 (0, no inflammatory cells; 1, infiltration around crypt bases; 2, infiltration of  
150 muscularis mucosa; 3, infiltration of submucosa), and the percent area of each section was

6

151 scored on a scale of 0 to 4 (0, no involvement; 1,  $\leq 25\%$ ; 2,  $\leq 50\%$ ; 3,  $\leq 75\%$ ; 4,  $\leq 100\%$ ). Scoring  
152 was performed on distal colon, proximal colon, and jejunum (magnification 20X; 3 to 7 fields  
153 per section; 4 to 6 mice per group).

154

#### 155 **2.4. Quantification of transcriptional levels of cytokines and oxidative stress markers by** 156 **real-time PCR**

157 Total mRNA from intestinal tissues and organoids was extracted using a Nucleospin RNA II  
158 kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed using a High Capacity cDNA  
159 Archive Kit and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with SYBR Green (Thermo  
160 Fisher Scientific). The primer sequences were designed using Primer Express 3 (Thermo Fisher  
161 Scientific) and are available upon request. Melting curve analyses were performed for each  
162 sample and gene to confirm the specificity of the amplification. Because exposure to EN  
163 mixture (ENM) did not cause any significant alterations in *Polr2a* mRNA expression, the  
164 relative expression of each gene of interest was normalized to the relative expression of this  
165 gene. The quantification of the target gene expression was based on the comparative cycle  
166 threshold (Ct) value. The fold changes in the target genes were analysed by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

167

#### 168 **2.5. Bacterial DNA extraction and Illumina MiSeq sequencing**

169 Genomic DNA was extracted from cecal content using the DNA Stool kit (Macherey-Nagel).  
170 The quantity and the purity of DNA (expressed as the ratio of absorbance at 260 nm and 280  
171 nm (A260/A280)) were assessed using a NanoDrop® spectrophotometer (Ozyme). The  
172 sequencing library was generated by amplifying the V3-V4 region of the bacterial 16S-rRNA  
173 gene using 16S rRNA amplicon generation for MiSeq with the primers Bact-0341  
174 (CCTACGGGNGGCWGCAG) and Bact-0785 (GACTACHVGGGTATCTAATCC).

175 Individual samples were barcoded, pooled to construct the sequencing library, and sequenced  
176 using an Illumina MiSeq system to generate paired-end 2x300 bp reads.

177

## 178 **2.6. Analysis of sequencing data**

179 Bioinformatic analyses were performed using the QIIME 2 pipeline (v.2020.2) (Bolyen et al.,  
180 2019). The Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) plug-in in QIIME2 was used  
181 to filter, dereplicate, identify chimeric sequences, and merge paired-end reads to obtain the set  
182 of amplicon sequence variants (ASVs) for each sample (Callahan et al., 2016). Then the  
183 representative sequences were picked for each ASV. The classify-sklearn plug-in in QIIME2,  
184 with the SILVA database (v.132) was applied to assign a taxonomic annotation to each  
185 representative ASV sequence. In the next step, ASVs identified as eukaryotic contamination  
186 (no contamination) and external contamination, identified with the decontam package (15 ASV;  
187 1599 reads), were filtered out (Davis et al., 2018). Diversity metrics ( $\alpha$  and  $\beta$ ) were obtained  
188 with the QIIME2 core-metrics-phylogenetic plug-in, with p-sampling depth parameter fixed to  
189 11916 reads which corresponded to the total frequency that each sample should be rarefied to  
190 before computing diversity metrics. This sampling depth allowed retention of >59% of reads  
191 discarding no sample. Tests for differential relative abundance were performed using the Mann-  
192 Whitney U test (GraphPad, San Diego, CA).

193

## 194 **2.7. Dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis**

195 Colitis was induced by adding 2% (w/v) DSS (TdB Labs) in the drinking water for 6 days.  
196 Fresh DSS solutions were prepared every 2 days. Mice body weight was recorded during the  
197 experiment. At necropsy, colon was carefully dissected and its weight and size were measured.  
198 Colon was then either immediately frozen or fixed in 4% formaldehyde (VWR Chemicals).

199



## 200 **2.8. Organoid study**

201 Murine organoids were derived from colon tissue of male C57BL/6 mice (aged 7 weeks). As  
202 described in Co et al., 2019, tissue fragments were incubated in 2 mM EDTA in cold chelation  
203 buffer on ice for 30 minutes (Co et al., 2019). The EDTA buffer was removed and tissue  
204 fragments were vigorously shaken in cold chelation buffer to isolate intestinal crypts. Isolated  
205 crypts were embedded in Matrigel (Growth Factor Reduced; Corning) on ice and seeded into a  
206 24-well tissue culture plate. Then 500  $\mu$ L of growth media and 50% L-WRN-conditioned media  
207 were added. Colon organoids were grown embedded in Matrigel for 7-14 days with growth  
208 media. Matrigel-embedded organoids were solubilized in 5 mM EDTA in PBS for 1 h at 4°C  
209 on a rotating platform. Organoids were centrifuged at 200 x g for 3 min at 4°C and the  
210 supernatant was removed. The pellet was resuspended in growth media in ultra-low attachment  
211 24-well tissue culture plates (Corning Costar). Suspended organoids were incubated at 37°C  
212 with 5% CO<sub>2</sub> for 2 days so that they could invert and present the apical side to the exterior.  
213 Inverted organoids were treated with 0.02, 0.2, and 2  $\mu$ M of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> EN for 24  
214 h. Cell death was measured using the Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche) according to  
215 the manufacturer's protocol.

216

## 217 **2.9. Statistical analysis**

218 Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. The statistical significance of differences between  
219 experimental groups was calculated using the Mann-Whitney U test (GraphPad, San Diego,  
220 CA).

221

## 222 **3. Results**

223

### 224 **3.1. Characterization of EN**

225 Figure 1A shows typical TEM images and EDX spectra of the 4 EN samples. Image analysis  
226 of 308 Ag particles indicated an area equivalent mean diameter of 8.6 nm (SD=2.4 nm). Image  
227 analysis of 261 SiO<sub>2</sub> particles yielded a mean equivalent diameter of 21.1 nm (SD=6.0 nm). In  
228 the case of Ti samples, we noticed the presence of aggregated spherical Ti nanoparticles with  
229 individual particle sizes ranging from 5 nm to 350 nm. Despite several attempts to deposit a  
230 uniform layer of TiO<sub>2</sub> particles, the noisy TEM image did not allow for statistical size analysis  
231 but an average equivalent diameter of 14.6 nm was estimated by manual sizing. X-ray spectra  
232 did not show the presence of contaminant elements. The copper peak was attributed to the TEM  
233 copper mesh support grid. As shown in the elemental map of the ENM (Fig. 1B), all expected  
234 elements (Si, Ag, Ti, and O) were identified by X-ray emission spectrometry. Chemical and  
235 topographic maps of the ENM showed spherical particles containing titanium (Ti or TiO<sub>2</sub>)  
236 covered with Ag and SiO<sub>2</sub> nanoparticles.

237

### 238 **3.2. Effects of ENM exposure on gut inflammation**

239 Adult male and female mice were exposed by inhalation to the ENM or to control inhalation  
240 (Suppl. Fig. 1A). Body weight over the 28-day duration of the experiment did not vary  
241 significantly in males or females (Suppl. Fig. 1B). To assess the inflammatory status of  
242 intestinal tissues, we performed a histological scoring of inflammation in distal colon, proximal  
243 colon, and jejunum. In males, the inflammatory infiltration score did not change between the  
244 groups (Fig. 2A-C), even if a trend to enhancement of this score was observed in jejunum. For  
245 comparison of cytokines, in distal colon, transcript levels of *Tnfα*, *Ifnγ*, *Il22*, and *Il10* were  
246 significantly increased in ENM-exposed mice compared to control mice (Fig. 2D). In proximal  
247 colon, there was a significant enhancement of the mRNA levels of *Tnfα*, *Il1β*, *Il10*, and *Cxcl1*  
248 (Fig. 2E). In jejunum, ENM exposure led to a drastic decrease of *Tnfα*, *Ifnγ*, *Il1β*, *Il17a*, *Il22*,  
249 *Il10*, and *Cxcl1* mRNA expression (Fig. 2F).

10

250 In female mice, exposure to ENM did not induce significant variation of inflammatory  
251 infiltration score in distal colon, proximal colon, and jejunum (Fig. 3A-C). *Cxcl1* transcripts  
252 were down-regulated in distal colon of ENM-exposed mice (Fig. 3D). A decrease of *Il1 $\beta$*  in  
253 proximal colon and a reduction of *Tnf $\alpha$* , *Il1 $\beta$*  and *Il22* in jejunum of ENM-exposed mice  
254 compared to control mice was also observed (Fig. 3E-F).

255

### 256 3.3. Effects of ENM exposure on gut microbiota.

257 The bacterial diversity in cecal content was determined by pyrosequencing of the bacterial 16S  
258 rRNA genes. Exposure to ENM did not significantly affect  $\alpha$ -diversity (data not shown). In  
259 males, unweighted uniFrac index showed a significant increase of  $\beta$ -diversity in ENM-exposed  
260 mice compared to control mice ( $p=0.004$ ; Fig. 4A). The relative abundance of ASVs at phylum,  
261 class, order, and family taxonomic levels was compared. The major phyla were *Firmicutes* and  
262 *Bacteroidetes* and the *Tenericutes* were less abundant in ENM-exposed mice (Fig. 4B). ENM  
263 exposure also induced in male mice a decrease of *Coriobacteriia* and *Mollicutes* classes, and  
264 of *Coriobacteriales* and *Mollicutes* RF39 orders (Fig. 4C-D). The only family which showed  
265 significantly different abundance in exposed male mice was *Eggerthellaceae* (Fig. 4E). In  
266 females, the unweighted uniFrac index was increased significantly after exposure to ENM  
267 ( $p=0.008$ ; Suppl. Fig. 2). As expected, in females, the cecum microbiota was also mostly  
268 composed of bacteria belonging to *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla (Fig. 5A). The relative  
269 abundance of *Proteobacteria* and *Actinobacteria* was decreased in ENM-exposed mice. At the  
270 class level, abundances of *Deltaproteobacteria* and *Coriobacteriia* were lower after exposure  
271 to ENM (Fig. 5B). A significant reduction of the levels of *Desulfovibrionales* and  
272 *Coriobacteriales* orders in ENM-exposed female mice was also observed (Fig. 5C). Finally,  
273 like males, females showed a lower abundance of *Eggerthellaceae* family after exposure to  
274 ENM (Fig. 5D).

275

**276 3.4. Effects of ENM exposure in a mouse model of colitis**

277 Male mice were submitted to DSS administration in the last 6 days of the ENM inhalation  
278 protocol (Suppl Fig. 3A). A significant body weight loss was observed in ENM-exposed mice  
279 compared to control mice from the third to the last day of DSS treatment (Fig. 6A). The colon  
280 weight/size ratio and the histological inflammatory infiltration score were not modified between  
281 the 2 groups of mice (Fig. 6B and Suppl Fig. 3B). The transcript levels of *Tnf $\alpha$*  and *Ifn $\gamma$*  were  
282 higher in colitic ENM-exposed mice than in colitic control mice (Fig. 6C).

283 The same protocol was performed with female mice (Suppl Fig. 3C). Colitic ENM-exposed  
284 mice lost more weight than colitic control mice from the fourth to the last day of DSS treatment  
285 (Fig. 6D). The colon weight/size ratio was significantly increased in the ENM-exposed group,  
286 as well as the histological score of colitis (Fig. 6E and Suppl Fig. 3D). The expression of  
287 inflammatory cytokines was upregulated in the colon of ENM-exposed mice, particularly *Ifn $\gamma$*   
288 and *Cxcl1* (Fig. 6F). These data show that ENM exposure induces higher susceptibility to colitis  
289 development, and that this increased sensitivity to colitis is greater in females than in males.

290

**291 3.5. Effects of EN on gut organoids**

292 We then assessed the effects of individual EN on intestinal epithelium. For this purpose, we  
293 used mouse intestinal organoids which model *in vitro* a 3D microarchitecture and possess a  
294 cellular composition resembling native intestinal epithelium. The organoids were generated  
295 from pluripotent stem cells which were differentiated into enterocytes, stem cells, goblet cells,  
296 Paneth cells, enteroendocrine cells, and mesenchymal cells. We treated organoids with 0.02,  
297 0.2, and 2  $\mu$ M of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> EN for 24 h. These concentrations did not induce  
298 cytotoxicity as confirmed by the LDH assay (Suppl. Fig. 3). Ag enhanced the expression of the  
299 chemokines *Ccl5*, *Ccl20*, and *Ccl10* and of the alarmins *Il1 $\alpha$*  and *Il33* (Fig. 7A). SiO<sub>2</sub> increased

12



300 the transcript levels of *Tnf $\alpha$*  and *Cxcl10* even at the lowest dosage, and enhanced *Il1 $\alpha$*   
301 expression (Fig. 7B). Ti increased *Tnf $\alpha$* , *Ccl5*, *Cxcl10*, and *Il33* and decreased *Cxcl1* mRNA  
302 levels (Fig. 7C). TiO<sub>2</sub> downregulated and upregulated the expression of *Cxcl1* and *Il33*,  
303 respectively (Fig. 7D).

304

#### 305 **4. Discussion**

306 The fate of inhaled nanoparticles has been studied in lung, brain, and at the systemic level, but  
307 little is known about responses in the digestive tract. However, it has been shown that inhaled  
308 particles can be directed to the intestinal tract via the mucociliary clearance process. This  
309 process mainly affects larger particles, but also includes nanoparticles. For example, detection  
310 of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in feces following inhalation demonstrated a mucociliary clearance and  
311 ingestion of nanoparticles (Pujalté et al., 2017). Moreover, inhaled Ag nanoparticles are cleared  
312 via the larynx into the gastro-intestinal tract, and in addition, via blood, liver, and gall bladder  
313 into the gastro-intestinal tract with one common excretional pathway: via feces out of the body  
314 (Kreyling et al., 2020). Nanoparticles can translocate into the bloodstream from which they can  
315 then impact all tissues of the body, either by direct contact or by various indirect routes (Miller  
316 et al., 2017). The aim of this study was to assess whether EN present in ambient air are likely  
317 to impact intestinal health in adults. The constant increase in EN production worldwide has led  
318 to the presence of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the air. In addition to potential high  
319 workplace exposures to each of these EN, chronic low-dose exposure of the general population  
320 may occur if current production trends continue. It is therefore important to assess the health  
321 effects of such exposures, and particularly on the intestinal tissues which are increasingly  
322 recognized as an important target for inhaled particles (Feng et al., 2020; Vignal et al., 2021).  
323 In this study, healthy adult mice were exposed for 4 h per day for 28 days to a mixture of the 4  
324 EN most commonly found in ambient air, each at a dose of 1 mg/m<sup>3</sup>. The range of EN present

325 in the air is not known, so it is not currently possible to assess the relevance of this dose to  
326 human exposure. However, this dosage is within the range that has been used in other similar  
327 studies. For example, Umezawa et al. exposed mice in an inhalation chamber to 4.6 or 37 mg/m<sup>3</sup>  
328 of Printex 90 carbon black nanoparticles for 15 days (Umezawa et al., 2018). Wahle et al.  
329 exposed mice via nose only inhalation to CeO<sub>2</sub> nanoparticles with varying amounts of Zr-  
330 doping (0%, 27%, or 78% Zr) over a 4-week period (4 mg/m<sup>3</sup> for 3 h/day, 5 days/week) (Wahle  
331 et al., 2020). These experimental protocols allow a primary toxicological evaluation ahead of  
332 more in-depth dose-response studies.

333 At the histological level, we did not observe any significant differences between exposed and  
334 control mice, showing that inhalation of ENM did not induce drastic damage in intestinal  
335 tissues. However, more sensitive methods such as qPCR allowed us to highlight sex-specific  
336 modifications. In males, we observed upregulation of numerous inflammatory cytokines in both  
337 distal and proximal colon. By contrast, in male jejunum, all the inflammatory markers were  
338 found strongly downregulated in mice exposed to ENM. In females, the pattern of inflammatory  
339 biomarkers was only slightly modified in distal and proximal colon. Moreover, inhalation of  
340 ENM induced a drastic decrease in expression of several inflammatory cytokines in jejunum,  
341 similarly to males. Thus, under basal conditions, inhalation of ENM did not induce overt  
342 inflammation in intestinal tissue. However, among the few inflammatory markers quantified,  
343 several were found to be significantly modified in favor of micro-inflammation, particularly in  
344 male colon. In accordance with these data, a micro-inflammatory state has been described after  
345 oral exposure to TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and Ag nanoparticles (Lamas et al., 2020).

346 Modifications of cecal microbiota composition were compared between exposed and non-  
347 exposed mice at several taxonomic levels. Males exposed to ENM showed a decreased  
348 abundance of the *Tenericutes* phylum, *Mollicutes* class, and *Mollicutes* RF39 order. In mice,  
349 *Mollicutes* have been shown to be decreased in TNBS-induced colitis (P. Li et al., 2019) and

350 after subchronic oral toxic metal exposure (Zhai et al., 2017). The abundance of *Mollicutes* is  
351 decreased in fecal microbiota of patients with colon Crohn's disease and ulcerative colitis, and  
352 shown to be increased in a patient with ileal Crohn's disease (Willing et al., 2010). Gut  
353 microbiota of obese patients also shows a greater proportion of *Mollicutes* (Crovesy et al.,  
354 2020). Moreover, we observed a reduction of *Proteobacteria* phylum, *Deltaproteobacteria*  
355 class, and *Desulfovibrionales* order in females exposed to ENM. The presence of  
356 *Desulfovibrionales* bacteria in gut microbiota has been associated with Parkinson's disease  
357 (Murros et al., 2021) and autism spectrum disorder (de Theije et al., 2014). A 16S microbiota  
358 sequencing study has also shown that bacteria of the *Desulfovibrionales* order were present  
359 within the ileal submucosal tissues of most Crohn's disease patients but absent in the control  
360 group (Chiodini et al., 2015). Notably, we identified microbiota modifications by ENM  
361 exposure which were common to both males and females. Microbiota of ENM-exposed males  
362 was characterized by less abundance of *Coriobacteriia* class, *Coriobacteriales* order, and  
363 *Eggerthellaceae* family. Similarly, microbiota of ENM-exposed females exhibited lower levels  
364 of *Actinobacteria* phylum, *Coriobacteriia* class, *Coriobacteriales* order, and *Eggerthellaceae*  
365 family. The abundance of *Eggerthellaceae* has been associated with the intensity of 5-  
366 fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice (Chen et al., 2021). It was found to be  
367 increased in gut of patients with psoriasis (Sikora et al., 2020). Furthermore, this family has  
368 been suggested to play a critical role in occurrence and development of osteoporosis (Wen et  
369 al., 2020). Taken together, these results show that ENM exposure induced sex-dependent and -  
370 independent modifications of fecal microbiota composition, which could play a role in the  
371 micro-inflammatory state observed in mouse gut.

372 The sex-dependency of EN toxicity has been widely observed (Bao et al., 2020; Lovaković et  
373 al., 2021; Ma et al., 2018). This variability between males and females is often attributed to the  
374 differences in sexual hormone signalling. Androgens, estrogens, and progesterone modulate



375 intestinal inflammation and shape gut microbiota (Pace and Watnick, 2021). Beyond the  
376 differences in the expression of sex hormones, a sexual dimorphism in peripheral and intestinal  
377 immunity, as well as in intestinal microbiome is known (Elderman et al., 2018). The tissue  
378 accumulation and clearance of nanoparticles can be also sex-specific (Bao et al., 2020; Lee et  
379 al., 2020). In *ex vivo* ileal tissue, a sex-dependency has been demonstrated for cytokines,  
380 chemokines and intestinal permeability genes in response to Ag EN (Gokulan et al., 2021).  
381 Finally, the sex-dependency of EN toxicity can be explained by sex specific differences of EN  
382 uptake at the cellular level, as demonstrated in amniotic stem cells and in primary fibroblasts  
383 (Serpooshan et al., 2018).

384 Under inflammatory conditions, both male and female mice exposed to ENM had a greater  
385 susceptibility to DSS-induced colitis. Therefore, despite low deleterious effects in healthy  
386 individuals, inhalation of ENM caused visible clinical effects in susceptible individuals. These  
387 data suggest that inhalation of ENM could aggravate diseases mediated by the immune system  
388 such as inflammatory bowel diseases.

389 We also investigated the potential of each EN to disturb the inflammatory response in intestinal  
390 epithelium. Both Ti and TiO<sub>2</sub> decreased expression of *Cxcl1* and increased expression of *Il33*.  
391 Ag and Ti had a strong ability to enhance the expression *Cxcl10* (10- and 19-fold, respectively,  
392 at 0.2 μM). Overall, TiO<sub>2</sub> had the least impact on intestinal inflammatory response, whereas it  
393 is the EN with the most documented deleterious effects on intestinal health (Rinninella et al.,  
394 2021). Accordingly, Kämpfer et al. observed stronger toxic effects of polyvinylpyrrolidone-  
395 capped Ag engineered nanomaterials than TiO<sub>2</sub> in Caco-2 and HT-29-MTX-E12 monocultures  
396 (Kämpfer et al., 2021). *Ex vivo*, treatment with 20 μg/mL of Ag EN induced sex-dependent  
397 alterations of cytokine secretion in human excised intestinal tissues (Gokulan et al., 2021). As  
398 a whole, each of the 4 tested EN elicited specific responses in colonoids.

### 399 **Conclusion**

400 The presence of EN in the air breathed by mice caused sex-dependent intestinal disturbances  
401 regarding inflammatory status and microbiota composition. Likewise, inhalation of ENM  
402 increased susceptibility to DSS-induced colitis in mice. We also showed that exposure to Ag,  
403 SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> EN led to specific inflammatory responses in gut epithelium. These findings  
404 suggest that respiratory exposure to common formulations of nanoscale particulates may  
405 facilitate the induction of a pro-inflammatory state localized within the intestine, alterations in  
406 gut microbiota composition, and modulation of susceptibility to chronic inflammatory  
407 conditions with the GI tract. Moreover, many of these effects may be differentially observed in  
408 exposed males and females, providing a new evidence of the sex-specificity of gut response to  
409 environmental chemicals.

410

#### 411 **Funding**

412 This work was supported by the Hauts de France Region and the Ministère de l'Enseignement  
413 Supérieur et de la Recherche (CPER Climibio), and the European Fund for Regional Economic  
414 Development.

415

#### 416 **Acknowledgements**

417 We thank Thomas Hubert and the staff of the animal facility of Lille for animal care. We thank  
418 Bernadette Leu for her broad-spectrum help. Editorial assistance, in the form of language  
419 editing and correction, was provided by XpertScientific Editing and Consulting Services.

420

#### 421 **References**

- 422 Bakand, S., Hayes, A., Dechsakulthorn, F., 2012. Nanoparticles: A review of particle  
423 toxicology following inhalation exposure. *Inhal. Toxicol.* 24, 125–35.  
424 <https://doi.org/10.3109/08958378.2010.642021>  
425 Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A.,  
426 Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger,  
427 K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez,

17

- 428 A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas,  
429 G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J.,  
430 Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J.,  
431 Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S.,  
432 Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley,  
433 S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciolk, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley,  
434 R., Liu, Y.-X., Lofthield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D.,  
435 McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T.,  
436 Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T.,  
437 Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A.,  
438 Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song,  
439 S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A.,  
440 Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y.,  
441 Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber,  
442 K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q.,  
443 Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible  
444 microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857.  
445 <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- 446 Boverhof, D.R., Krieger, S.M., Hotchkiss, J.A., Stebbins, K.E., Thomas, J., Woolhiser, M.R.,  
447 2013. Assessment of the immunotoxic potential of trichloroethylene and  
448 perchloroethylene in rats following inhalation exposure. *J. Immunotoxicol.* 10, 311–  
449 320. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.735275>
- 450 Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016.  
451 DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat.*  
452 *Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- 453 Chen, K.-J., Chen, Y.-L., Ueng, S.-H., Hwang, T.-L., Kuo, L.-M., Hsieh, P.-W., 2021.  
454 Neutrophil elastase inhibitor (MPH-966) improves intestinal mucosal damage and gut  
455 microbiota in a mouse model of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. *Biomed.*  
456 *Pharmacother.* 134, 111152. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111152>
- 457 Chiodini, R.J., Dowd, S.E., Chamberlin, W.M., Galandiuk, S., Davis, B., Glassing, A., 2015.  
458 Microbial Population Differentials between Mucosal and Submucosal Intestinal  
459 Tissues in Advanced Crohn’s Disease of the Ileum. *PLOS ONE* 10, e0134382.  
460 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134382>
- 461 Chouirfa, H., Bouloussa, H., Migonney, V., Falentin-Daudré, C., 2019. Review of titanium  
462 surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta*  
463 *Biomater.* 83, 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036>
- 464 Co, J.Y., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A.T., Kuo, C.J., Monack, D.M., Amieva, M.R.,  
465 2019. Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen  
466 Interactions. *Cell Rep.* 26, 2509–2520.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.108>
- 467 Crovesy, L., Masterson, D., Rosado, E.L., 2020. Profile of the gut microbiota of adults with  
468 obesity: a systematic review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 74, 1251–1262.  
469 <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0607-6>
- 470 Davis, N.M., Proctor, D.M., Holmes, S.P., Relman, D.A., Callahan, B.J., 2018. Simple  
471 statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and  
472 metagenomics data. *Microbiome* 6, 226. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0605-2>
- 473 de Theije, C.G.M., Wopereis, H., Ramadan, M., van Eijndthoven, T., Lambert, J., Knol, J.,  
474 Garssen, J., Kraneveld, A.D., Oozeer, R., 2014. Altered gut microbiota and activity in  
475 a murine model of autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun.* 37, 197–206.  
476 <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.005>



- 477 Feng, J., Cavallero, S., Hsiai, T., Li, R., 2020. Impact of air pollution on intestinal redox  
478 lipidome and microbiome. *Free Radic. Biol. Med.*  
479 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.044>
- 480 Gokulan, K., Williams, K., Orr, S., Khare, S., 2021. Human Intestinal Tissue Explant  
481 Exposure to Silver Nanoparticles Reveals Sex Dependent Alterations in Inflammatory  
482 Responses and Epithelial Cell Permeability. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9.  
483 <https://doi.org/10.3390/ijms22010009>
- 484 Gupta, R., Xie, H., 2018. Nanoparticles in Daily Life: Applications, Toxicity and Regulations.  
485 *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 37.  
486 <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026009>
- 487 Hadrup, N., Sharma, A.K., Loeschner, K., Jacobsen, N.R., 2020. Pulmonary toxicity of silver  
488 vapours, nanoparticles and fine dusts: A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 115,  
489 104690. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104690>
- 490 Hansen, S.F., Heggelund, L.R., Besora, P.R., Mackevica, A., Boldrin, A., Baun, A., 2016.  
491 Nanoproducts—what is actually available to European consumers? *Environ. Sci. Nano*  
492 3, 169–180.
- 493 Inshakova, E., Inshakova, A., Goncharov, A., 2020. Engineered nanomaterials for energy  
494 sector: market trends, modern applications and future prospects. *IOP Conf. Ser. Mater.*  
495 *Sci. Eng.* 971, 032031. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/971/3/032031>
- 496 Kämpfer, A.A.M., Busch, M., Büttner, V., Bredeck, G., Stahlmecke, B., Hellack, B., Masson,  
497 I., Sofranko, A., Albrecht, C., Schins, R.P.F., 2021. Model Complexity as  
498 Determining Factor for In Vitro Nanosafety Studies: Effects of Silver and Titanium  
499 Dioxide Nanomaterials in Intestinal Models. *Small* 17, 2004223.  
500 <https://doi.org/10.1002/sml.202004223>
- 501 Kim, Y.-S., Chung, Y.-H., Seo, D.-S., Choi, H.-S., Lim, C.-H., 2018. Twenty-Eight-Day  
502 Repeated Inhalation Toxicity Study of Aluminum Oxide Nanoparticles in Male  
503 Sprague-Dawley Rats. *Toxicol. Res.* 34, 343–354.  
504 <https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.3.343>
- 505 Kreyling, W.G., Holzwarth, U., Hirn, S., Schleh, C., Wenk, A., Schäffler, M., Haberl, N.,  
506 Gibson, N., 2020. Quantitative biokinetics over a 28 day period of freshly generated,  
507 pristine, 20 nm silver nanoparticle aerosols in healthy adult rats after a single 1½-hour  
508 inhalation exposure. *Part. Fibre Toxicol.* 17, 21. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00347-1>
- 509
- 510 Lamas, B., Martins Breyner, N., Houdeau, E., 2020. Impacts of foodborne inorganic  
511 nanoparticles on the gut microbiota-immune axis: potential consequences for host  
512 health. *Part. Fibre Toxicol.* 17, 19. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00349-z>
- 513 Lee, S.H., Jun, B.-H., 2019. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for  
514 Nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
- 515 Li, P., Lei, J., Hu, G., Chen, X., Liu, Z., Yang, J., 2019. Matrine mediates inflammatory  
516 response via gut microbiota in TNBS-induced murine colitis. *Front. Physiol.* 10, 28.
- 517 Li, R., Navab, K., Hough, G., Daher, N., Zhang, M., Mittelstein, D., Lee, K., Pakbin, P.,  
518 Saffari, A., Bhetraratana, M., Sulaiman, D., Beebe, T., Wu, L., Jen, N., Wine, E.,  
519 Tseng, C.-H., Araujo, J.A., Fogelman, A., Sioutas, C., Navab, M., Hsiai, T.K., 2015.  
520 Effect of exposure to atmospheric ultrafine particles on production of free fatty acids  
521 and lipid metabolites in the mouse small intestine. *Environ. Health Perspect.* 123, 34–  
522 41. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307036>
- 523 Li, X., Sun, H., Li, B., Zhang, X., Cui, J., Yun, J., Yang, Y., Zhang, L., Meng, Q., Wu, S.,  
524 Duan, J., Yang, H., Wu, J., Sun, Z., Zou, Y., Chen, R., 2019. Probiotics Ameliorate  
525 Colon Epithelial Injury Induced by Ambient Ultrafine Particles Exposure. *Adv. Sci.*  
526 *Weinh. Baden-Wurt. Ger.* 6, 1900972. <https://doi.org/10.1002/adv.201900972>

- 527 Malakar, A., Kanel, S.R., Ray, C., Snow, D.D., Nadagouda, M.N., 2021. Nanomaterials in the  
528 environment, human exposure pathway, and health effects: A review. *Sci. Total*  
529 *Environ.* 759, 143470. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143470>
- 530 Miller, M.R., Raftis, J.B., Langrish, J.P., McLean, S.G., Samutrtai, P., Connell, S.P., Wilson,  
531 S., Vesey, A.T., Fokkens, P.H.B., Boere, A.J.F., Krystek, P., Campbell, C.J., Hadoke,  
532 P.W.F., Donaldson, K., Cassee, F.R., Newby, D.E., Duffin, R., Mills, N.L., 2017.  
533 Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano* 11, 4542–  
534 4552. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08551>
- 535 Murros, K.E., Huynh, V.A., Takala, T.M., Saris, P.E.J., 2021. Desulfovibrio Bacteria Are  
536 Associated With Parkinson's Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 0.  
537 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.652617>
- 538 Murugadoss, S., Lison, D., Godderis, L., Van Den Brule, S., Mast, J., Brassinne, F., Sebaihi,  
539 N., Hoet, P.H., 2017. Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Arch. Toxicol.* 91,  
540 2967–3010. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1993-y>
- 541 Pereira, L.C., Pazin, M., Franco-Bernardes, M.F., Martins, A. da C., Barcelos, G.R.M.,  
542 Pereira, M.C., Mesquita, J.P., Rodrigues, J.L., Barbosa, F., Dorta, D.J., 2018. A  
543 perspective of mitochondrial dysfunction in rats treated with silver and titanium  
544 nanoparticles (AgNPs and TiNPs). *J. Trace Elem. Med. Biol.* 47, 63–69.  
545 <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.01.007>
- 546 Peters, R.J.B., Oomen, A.G., van Bommel, G., van Vliet, L., Undas, A.K., Munniks, S.,  
547 Bleys, R.L.A.W., Tromp, P.C., Brand, W., van der Lee, M., 2020. Silicon dioxide and  
548 titanium dioxide particles found in human tissues. *Nanotoxicology* 14, 420–432.  
549 <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1718232>
- 550 Prajitha, N., Athira, S.S., Mohanan, P.V., 2019. Bio-interactions and risks of engineered  
551 nanoparticles. *Environ. Res.* 172, 98–108.  
552 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.003>
- 553 Pujalté, I., Dieme, D., Haddad, S., Serventi, A.M., Bouchard, M., 2017. Toxicokinetics of  
554 titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles after inhalation in rats. *Toxicol. Lett.* 265, 77–  
555 85. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.014>
- 556 Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Mora, V., Gasbarrini, A., Mele, M.C., 2021. Impact of  
557 Food Additive Titanium Dioxide on Gut Microbiota Composition, Microbiota-  
558 Associated Functions, and Gut Barrier: A Systematic Review of In Vivo Animal  
559 Studies. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 2008.  
560 <https://doi.org/10.3390/ijerph18042008>
- 561 Rogers, K.R., Navratilova, J., Stefaniak, A., Bowers, L., Knepp, A.K., Al-Abed, S.R., Potter,  
562 P., Gitipour, A., Radwan, I., Nelson, C., Bradham, K.D., 2018. Characterization of  
563 engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products  
564 advertised to contain colloidal silver. *Sci. Total Environ.* 619–620, 1375–1384.  
565 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.195>
- 566 Rudramurthy, G.R., Swamy, M.K., 2018. Potential applications of engineered nanoparticles in  
567 medicine and biology: an update. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 23, 1185–1204.  
568 <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1600-6>
- 569 Sikora, M., Stec, A., Chrabaszcz, M., Knot, A., Waskiel-Burnat, A., Rakowska, A.,  
570 Olszewska, M., Rudnicka, L., 2020. Gut microbiome in psoriasis: An updated review.  
571 *Pathogens* 9, 463.
- 572 Sutunkova, M.P., Solovyeva, S.N., Chernyshov, I.N., Klinova, S.V., Gurvich, V.B., Shur,  
573 V.Y., Shishkina, E.V., Zubarev, I.V., Privalova, L.I., Katsnelson, B.A., 2020.  
574 Manifestation of Systemic Toxicity in Rats after a Short-Time Inhalation of Lead  
575 Oxide Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030690>



- 576 Tang, S., Zheng, J., 2018. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects.  
577 *Adv. Healthc. Mater.* 7, e1701503. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701503>
- 578 Umezawa, M., Onoda, A., Korshunova, I., Jensen, A.C.Ø., Koponen, I.K., Jensen, K.A.,  
579 Khodosevich, K., Vogel, U., Hougaard, K.S., 2018. Maternal inhalation of carbon  
580 black nanoparticles induces neurodevelopmental changes in mouse offspring. *Part.*  
581 *Fibre Toxicol.* 15, 36. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0272-2>
- 582 Vignal, C., Guilloteau, E., Gower-Rousseau, C., Body-Malapel, M., 2021. Review article:  
583 Epidemiological and animal evidence for the role of air pollution in intestinal diseases.  
584 *Sci. Total Environ.* 757, 143718. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143718>
- 585 Wahle, T., Sofranko, A., Dekkers, S., Miller, M.R., Heusinkveld, H.J., Albrecht, C., Cassee,  
586 F.R., Schins, R.P.F., 2020. Evaluation of neurological effects of cerium dioxide  
587 nanoparticles doped with different amounts of zirconium following inhalation  
588 exposure in mouse models of Alzheimer's and vascular disease. *Neurochem. Int.* 138,  
589 104755. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104755>
- 590 Wen, K., Tao, L., Tao, Z., Meng, Y., Zhou, S., Chen, J., Yang, K., Da, W., Zhu, Y., 2020.  
591 Fecal and Serum Metabolomic Signatures and Microbial Community Profiling of  
592 Postmenopausal Osteoporosis Mice Model. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 535310.  
593 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.535310>
- 594 Willing, B.P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A.F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot,  
595 G., Tysk, C., Jansson, J.K., Engstrand, L., 2010. A pyrosequencing study in twins  
596 shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease  
597 phenotypes. *Gastroenterology* 139, 1844–1854.
- 598 Yin, I.X., Zhang, J., Zhao, I.S., Mei, M.L., Li, Q., Chu, C.H., 2020. The Antibacterial  
599 Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int. J.*  
600 *Nanomedicine* 15, 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
- 601 Zhai, Q., Li, T., Yu, L., Xiao, Y., Feng, S., Wu, J., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., 2017.  
602 Effects of subchronic oral toxic metal exposure on the intestinal microbiota of mice.  
603 *Sci. Bull.* 62, 831–840.  
604

## 605 **Figure legends**

606

607 Fig. 1. (A) Transmission electron microscopic images and energy-dispersive X-ray spectra of  
608 typical nanoparticles from individual samples (Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub>). Scale bars represent  
609 100 nanometers. (B) Typical transmission electron microscopic images (backscattered electron  
610 detector for chemical contrast, secondary electron detector for morphological contrast) and  
611 elemental map of the nanoparticle mixture.

612

613 Fig. 2. The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on male gut  
614 inflammatory status. Male mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti,

615 and TiO<sub>2</sub> or to control inhalation (CT; n=10/group). (A-B-C) Representative images of  
616 intestinal tissues (MGG staining; scale bar=100 μm) and inflammatory infiltration score in  
617 distal colon (A), proximal colon (B), and jejunum (C). (D-E-F) Quantification of mRNA levels  
618 of inflammatory cytokines by qRT-PCR in distal colon (D), proximal colon (E), and jejunum  
619 (F). \*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.005$ , and \*\*\*\*= $p<0.001$  as determined by the Mann-  
620 Whitney U test.

621

622 Fig. 3. The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on female gut  
623 inflammatory status. Female mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag, SiO<sub>2</sub>,  
624 Ti and TiO<sub>2</sub> or to control inhalation (CT; n=10/group). (A-B-C) Representative images of  
625 intestinal tissues (MGG staining; scale bar=100 μm) and inflammatory infiltration score in  
626 distal colon (A), proximal colon (B), and jejunum (C). (D-E-F) Quantification of mRNA levels  
627 of inflammatory cytokines by qRT-PCR in distal colon (D), proximal colon (E), and jejunum  
628 (F). \*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , and \*\*\*= $p<0.005$  as determined by the Mann-Whitney U test.

629

630 Fig. 4. The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on male gut  
631 microbiota composition. Male mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag, SiO<sub>2</sub>,  
632 Ti, and TiO<sub>2</sub> or to control inhalation (CT; n=6/group). DNA was isolated from cecal content  
633 for MiSeq 16S ribosomal RNA gene sequencing. (A) Unweighted-uniFrac β-diversity index,  
634 \*\*\*= $p<0.005$  as determined by pairwise PERMANOVA. The relative abundance of bacteria  
635 was calculated based on amplicon sequence variants. (Bb) Overview of the relative abundance  
636 of gut bacteria depicted at the phylum level. The relative abundance of significantly changed  
637 bacterial phyla (Bb<sup>\*</sup>), classes (C), orders (D), and families (E). \*= $p<0.05$  as determined by the  
638 Mann-Whitney U test.

639

640 Fig. 5. The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on female gut  
641 microbiota composition. Female mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag,  
642 SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> or to control inhalation (CT; n=6/group). DNA was isolated from cecal  
643 content for MiSeq 16S ribosomal RNA gene sequencing. The relative abundance of bacteria  
644 was calculated based on amplicon sequence variants. (Aa) Overview of the relative abundance  
645 of gut bacteria depicted at the phylum level. The relative abundance of significantly changed  
646 bacterial phyla (Aa'), classes (B), orders (C), and families (D). \*= $p < 0.05$  as determined by the  
647 Mann-Whitney U test.

648

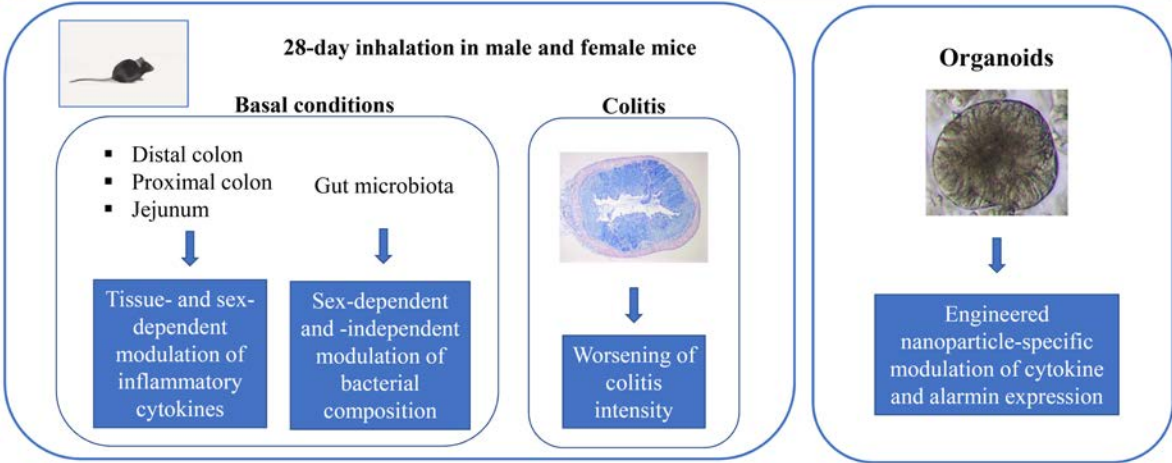
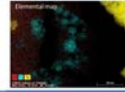
649 Fig. 6. The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on dextran  
650 sodium sulfate (DSS)-induced colitis development in males and females. Male and female mice  
651 were exposed to an airborne ENM consisting of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> (ENM) or to control  
652 inhalation (CT), and to a 2% DSS solution in drinking water in the last 6 days of the  
653 experimental protocol (n=10/group). (A) Male body weight variation during 6 days of DSS  
654 administration. (B) Male colon weight/size ratio. (C) Quantification of mRNA levels of  
655 inflammatory cytokines in male colon by qRT-PCR. (D) Female body weight variation during  
656 6 days of DSS administration. (E) Female colon weight/size ratio. (F) Quantification of mRNA  
657 levels of inflammatory cytokines in female colon by qRT-PCR. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , and  
658 \*\*\*\*= $p < 0.001$  as determined by the Mann-Whitney U test.

659

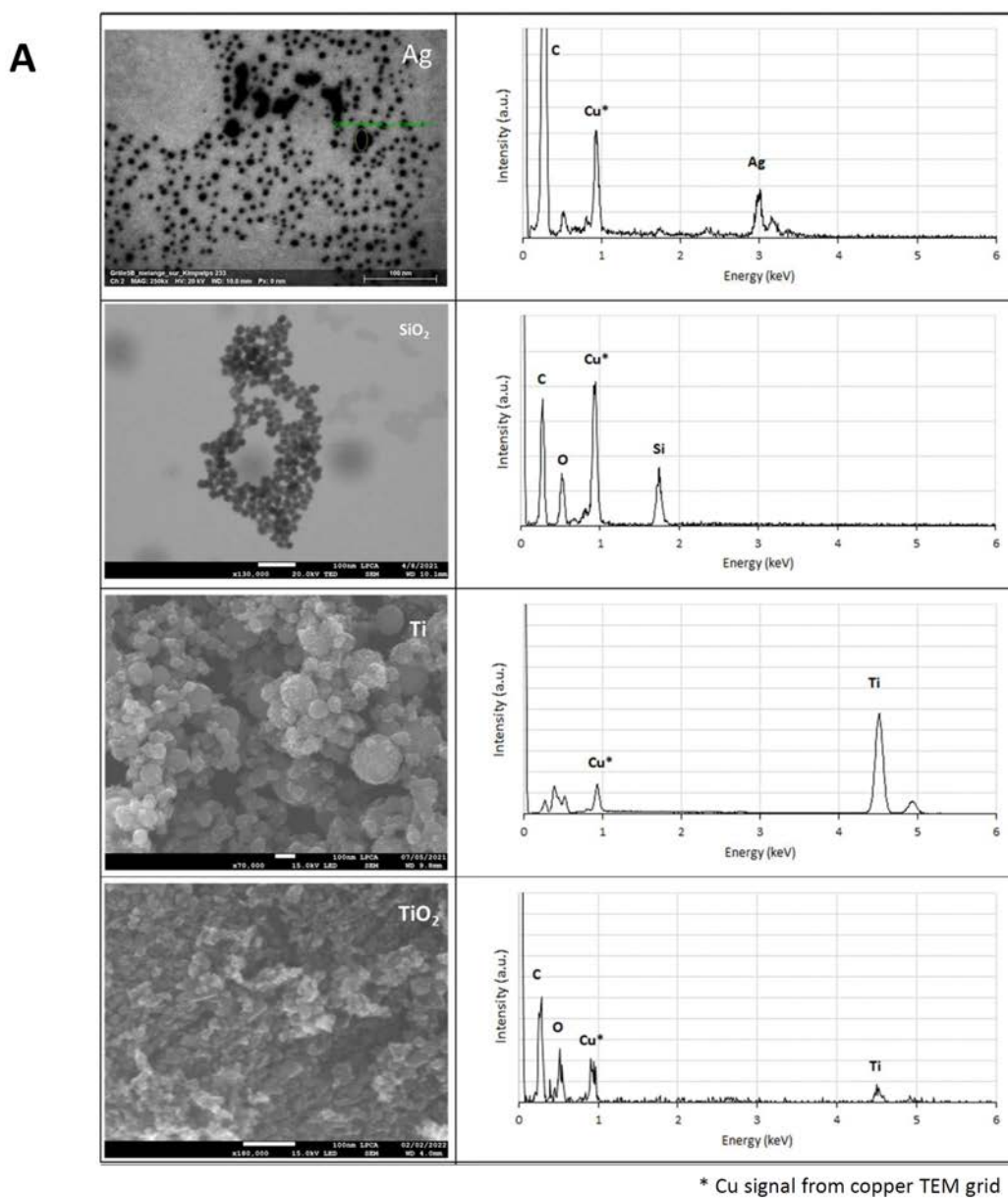
660 Fig. 7. The effects of the 4 engineered nanoparticles (EN) on gut organoid inflammatory  
661 response. Quantification of mRNA levels of inflammatory cytokines and alarmins by qPCR in  
662 inverted organoids treated with 0.02, 0.2, and 2  $\mu$ M of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> EN after 24 h  
663 exposure (n=4/condition). Results are presented as fold change compared to untreated  
664 organoids. \*= $p < 0.05$  as determined by the Mann-Whitney U test.

Exposure to atmospheric Ag, TiO<sub>2</sub>, Ti and SiO<sub>2</sub> engineered nanoparticles modulates inflammatory response and gut microbiota in mice

Most prevalent engineered nanoparticles in air:  
Silver (Ag), titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), titanium (Ti) and silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>):  
gut adverse effects?

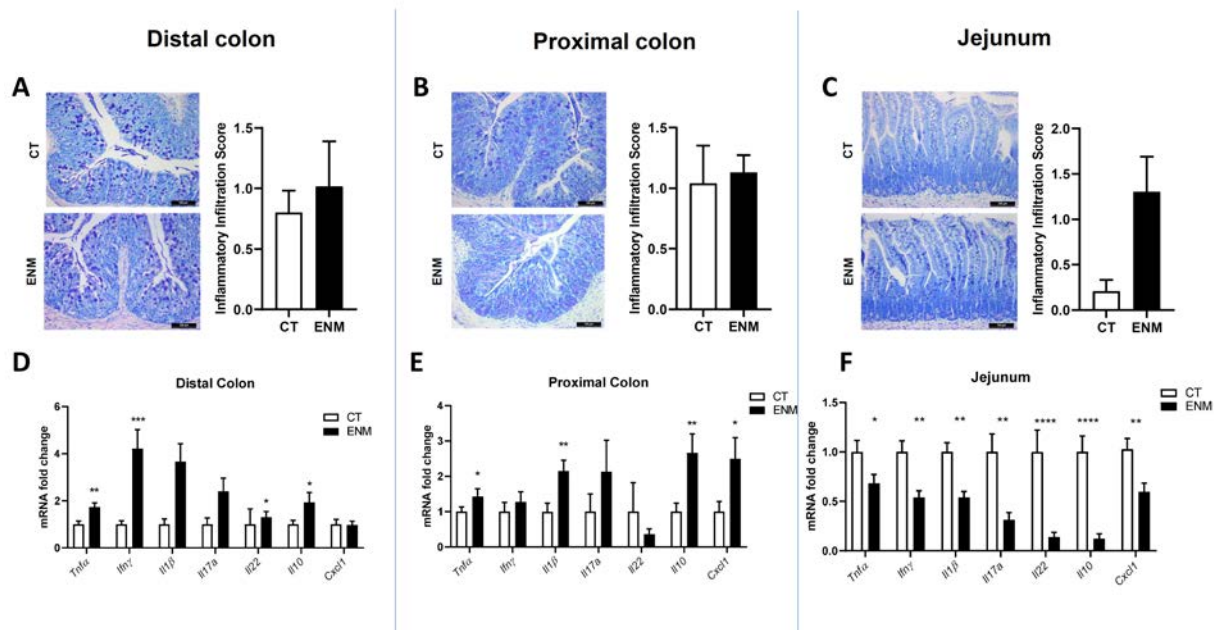




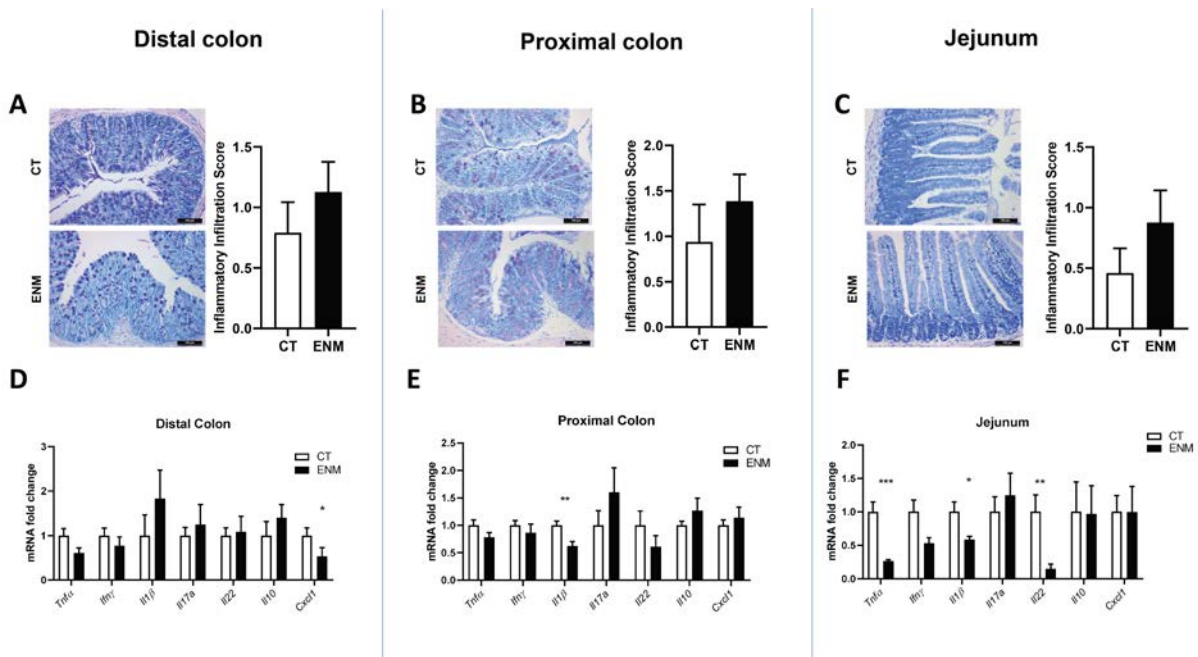


**Fig. 1.** (A) Transmission electron microscopic images and energy-dispersive X-ray spectra of typical nanoparticles from individual samples (Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub>). Scale bars represent 100 nanometers.

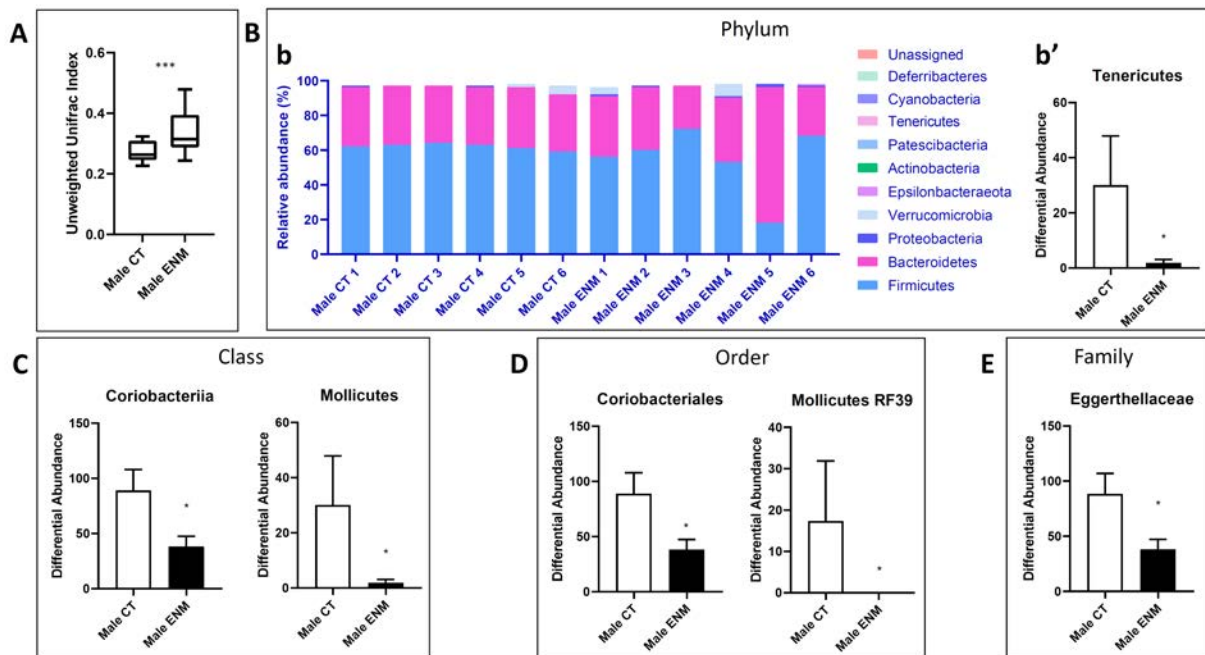
(B) Typical transmission electron microscopic images (backscattered electron detector for chemical contrast, secondary electron detector for morphological contrast) and elemental map of the nanoparticle mixture.



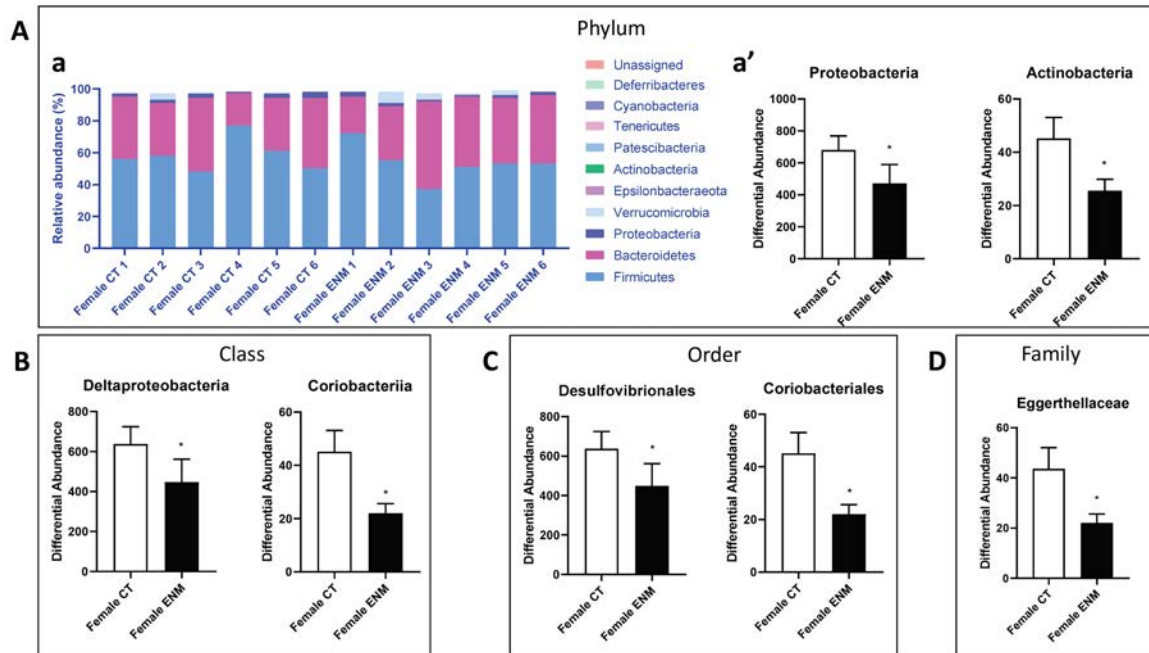
**Fig. 2.** The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on male gut inflammatory status. Male mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> or to control inhalation (CT; n=10/group). (A-B-C) Representative images of intestinal tissues (MGG staining; scale bar=100 μm) and inflammatory infiltration score in distal colon (A), proximal colon (B), and jejunum (C). (D-E-F) Quantification of mRNA levels of inflammatory cytokines by qRT-PCR in distal colon (D), proximal colon (E), and jejunum (F). \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.005, and \*\*\*\**p*<0.001 as determined by the Mann-Whitney U test.



**Fig. 3.** The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on female gut inflammatory status. Female mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti and TiO<sub>2</sub> or to control inhalation (CT; n=10/group). (A-B-C) Representative images of intestinal tissues (MGG staining; scale bar=100 μm) and inflammatory infiltration score in distal colon (A), proximal colon (B), and jejunum (C). (D-E-F) Quantification of mRNA levels of inflammatory cytokines by qRT-PCR in distal colon (D), proximal colon (E), and jejunum (F). \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, and \*\*\**p*<0.005 as determined by the Mann-Whitney U test.



**Fig. 4.** The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on male gut microbiota composition. Male mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> or to control inhalation (CT; n=6/group). DNA was isolated from cecal content for MiSeq 16S ribosomal RNA gene sequencing. (A) Unweighted-uniFrac  $\alpha$ -diversity index, \*\*\*= $p < 0.005$  as determined by pairwise PERMANOVA. The relative abundance of bacteria was calculated based on amplicon sequence variants. (Bb) Overview of the relative abundance of gut bacteria depicted at the phylum level. The relative abundance of significantly changed bacterial phyla (Bb'), classes (C), orders (D), and families (E). \*= $p < 0.05$  as determined by the Mann-Whitney U test.

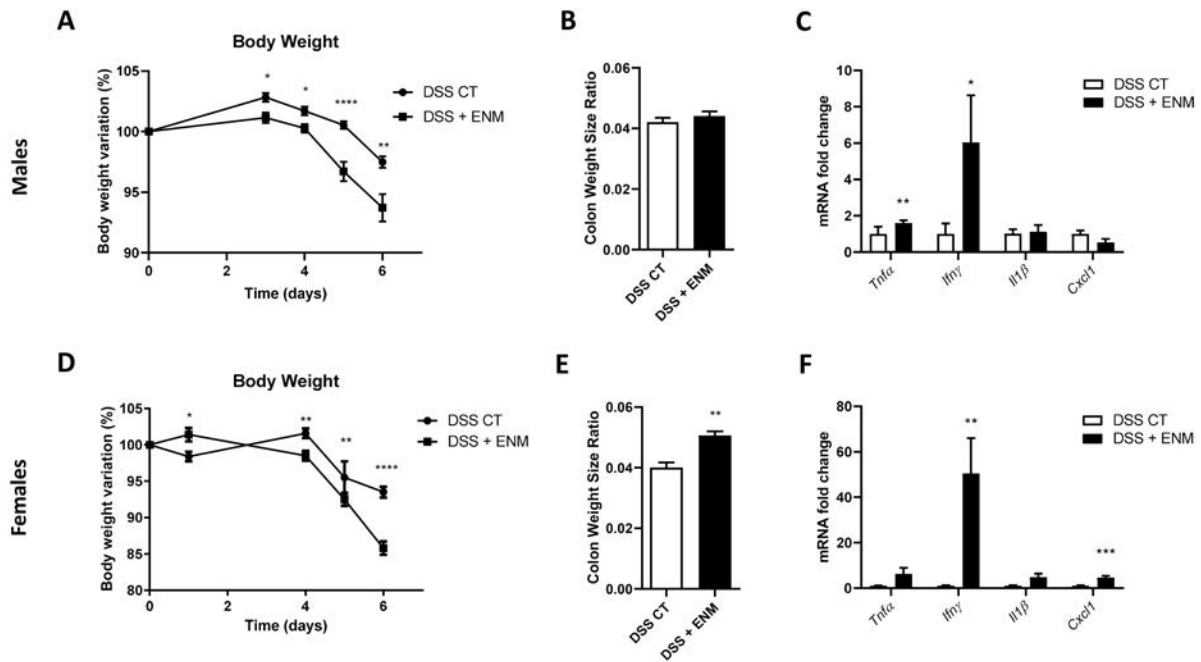


**Fig. 5.** The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (640 ENM) on female gut microbiota composition. Female mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag,SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> or to control inhalation (CT; n=6/group). DNA was isolated from cecal content for MiSeq 16S ribosomal RNA gene sequencing. The relative abundance of bacteria was calculated based on amplicon sequence variants.

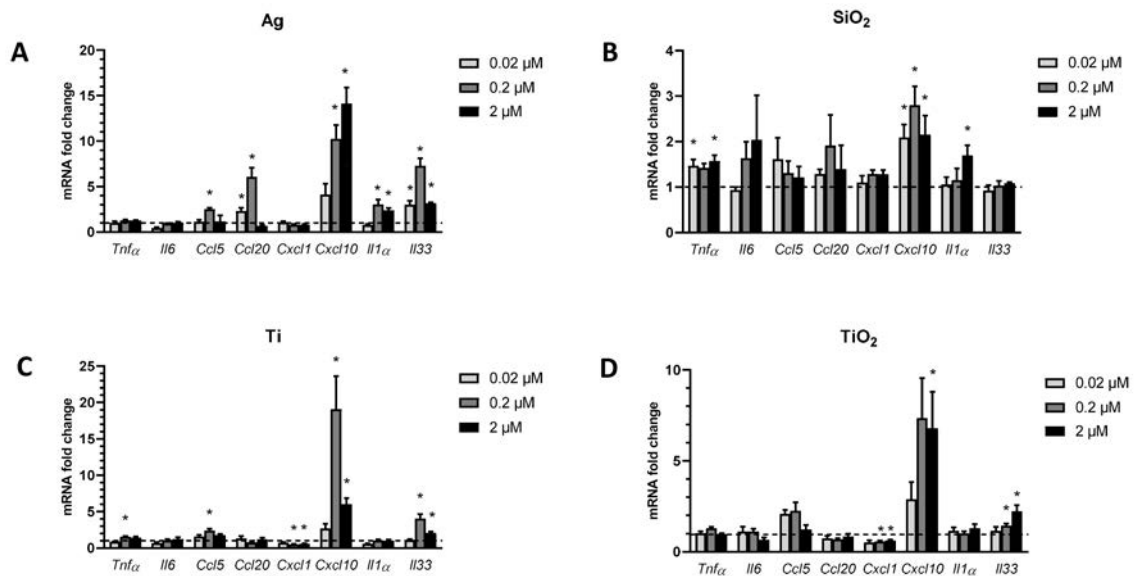
(Aa) Overview of the relative abundance of gut bacteria depicted at the phylum level. The relative abundance of significantly changed bacterial phyla (Aa'), classes (B), orders (C), and families (D).

\*=p<0.05 as determined by the Mann-Whitney U test.





**Fig.6.** The effects of inhalation of an engineered nanoparticle mixture (ENM) on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis development in males and females. Male and female mice were exposed to an airborne ENM consisting of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> (ENM) or to control inhalation (CT), and to a 2% DSS solution in drinking water in the last 6 days of the experimental protocol (n=10/group). (A) Male body weight variation during 6 days of DSS administration. (B) Male colon weight/size ratio. (C) Quantification of mRNA levels of inflammatory cytokines in male colon by qRT-PCR. (D) Female body weight variation during 6 days of DSS administration. (E) Female colon weight/size ratio. (F) Quantification of Mrna levels of inflammatory cytokines in female colon by qRT-PCR. \*=p<0.05, \*\*=p<0.01, and \*\*\*\*=p<0.001 as determined by the Mann-Whitney U test.



**Fig. 7.** The effects of the 4 engineered nanoparticles (EN) on gut organoid inflammatory response. Quantification of mRNA levels of inflammatory cytokines and alarmins by qPCR in inverted organoids treated with 0.02, 0.2, and 2 μM of Ag, SiO<sub>2</sub>, Ti, and TiO<sub>2</sub> EN after 24 h exposure (n=4/condition). Results are presented as fold change compared to untreated organoids. \*=p<0.05 as determined by the Mann-Whitney U test.

## Effet d'une exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique complexe sur le système intestinal de la descendance chez la so

Il est maintenant clairement établi que la pollution atmosphérique a des effets sanitaires avec des chiffres atteignant 307 000 décès prématurés en France en 2019 selon un rapport de l'Agence Européenne de l'environnement publié en novembre 2021. Il existe une grande disparité d'effets de cette pollution selon les lieux car sa composition est très complexe associant des gaz et des particules de différentes tailles. Cette composition est variable selon les sources d'émission, les saisons et les conditions météorologiques qui vont moduler le vieillissement de l'aérosol sous l'influence de processus photochimiques.

La pollution atmosphérique est responsable du développement ou de l'exacerbation de pathologies inflammatoires chroniques ainsi que de cancers du poumon. Mais de plus en plus on l'incrimine dans des effets extrapulmonaires au niveau cardio-vasculaire, neuronal, métabolique ainsi que des effets sur le développement suite à une exposition *in utero*. Il semble qu'il existe une fenêtre de susceptibilité à la pollution atmosphérique en phase gestationnelle. En effet il a ainsi été observé qu'une exposition à la pollution atmosphérique est associée dans la descendance à de nombreux déficits/ pathologies : asthme et allergies respiratoires ; eczéma et dermatite atopique ; dysfonctions cardiaques ; autisme, problèmes neuro-développementaux, santé mentale ; déficits immunitaires (355-358, 360). Ces données suggèrent que l'exposition en phase gestationnelle à la pollution atmosphérique potentialise dans la descendance le développement de pathologies liées au système immunitaire. Néanmoins à ce jour **aucune étude n'a exploré les effets de l'exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique sur le système immunitaire intestinal**. Ceci constitue l'objectif de mon second axe de recherche au cours de cette thèse.

Afin de permettre une exposition à la pollution atmosphérique dans toute sa globalité nous avons réalisé cette étude en collaboration avec la plateforme Cesam situé au Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphérique à Créteil. Elle dispose d'une chambre atmosphérique permettant de simuler des atmosphères et en l'occurrence pour notre étude nous avons privilégié une situation de pollution urbaine intense telle qu'elle peut se produire régulièrement à Pékin.

L'exposition s'est déroulée du 10<sup>ème</sup> jour au 17<sup>ème</sup> jour de la gestation et nous sommes intéressés à la période de la transition de l'allaitement au sevrage (17<sup>e</sup> jour) qui est une fenêtre critique pour le développement intestinal tant du point structural qu'immunitaire.

Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise au journal « Particle and Fibre Toxicology » et a été acceptée avec des corrections mineures. C'est celle-ci qui est présentée dans ce manuscrit.

### **MATERIEL ET METHODES :**

La génération des différentes atmosphères étudiées a été effectuée par l'équipe collaboratrice de ce projet (Institut Mondor de Recherche Biomédicale – INSERM U995 – Dr Sophie Lanone). Pour cela, la chambre CESAM a été utilisée (Chambre Expérimentale de Simulation Atmosphérique Multiphasique) (447). Cette chambre est une chambre de simulation atmosphérique dédiée à l'étude des processus atmosphériques. Elle permet de générer une atmosphère complexe très réaliste, représentant environ 2000 événements de pollution à Pékin pour étudier la multitude de produits provenant de l'oxydation atmosphérique des composés organiques primaires. L'air arrive dans une armoire où sont situées les souris exposées et les souris contrôles. L'air contrôle est obtenu par l'utilisation d'un filtre combiné à gaz, particules et suies et se situe à l'entrée du compartiment des souris contrôles.

L'exposition des souris a été effectuée en collaboration par l'équipe du Dr Lanone. Des souris primo-gestantes C57BL/6 ont été exposées à une atmosphère type Pékin vs Pékin filtré (contrôle) du 10<sup>ème</sup> au 17<sup>ème</sup> jour de gestation (période embryonnaire du développement pulmonaire) pendant 8 jours et 24 h par jour (n=5 souris par cage, avec 4 cages de souris par groupe ; n=20 CT et n=20 air pollué). Après la mise-bas, ayant eu lieu entre le 19<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour de gestation, les souriceaux mâles et femelles âgés de 17 jours ont été sacrifiés et leur tube digestif a été prélevé. Le caecum, colon proximal et l'iléon des souriceaux sont les trois parties du TGI présentant des variations et faisant l'objet des différentes analyses.

Le niveau d'expression d'ARNm de différents marqueurs pro inflammatoires spécifiques et représentatifs des réponses inflammatoires de type Th1, Th2, Th17 et Treg ont été quantifiés par RT-qPCR dans le caecum, le colon proximal et l'iléon des souriceaux.

En complément, afin de pouvoir observer les effets d'une exposition gestationnelle sur la maturation du système immunitaire intestinal, une analyse histologique, après coloration par May Grünwald Giemsa, a été effectuée pour établir la cellularité de la sous-muqueuse, l'aire de la surface du mucus, la hauteur des villosités dans le colon, la profondeur des cryptes dans l'iléon et la morphologie de ces vacuoles. Ces analyses histologiques ont pour objectif d'établir d'éventuels défauts de la maturation intestinale chez les souriceaux suite à cette exposition gestationnelle.

Des analyses plus approfondies ont été effectuées dans le colon proximal et l'iléon des souriceaux pour évaluer la prolifération, différenciation et maturation intestinales :

- Une analyse par immunohistochimie de l'expression du marqueur de prolifération nucléaire PCNA.
- Une analyse de la différenciation intestinale par RT-qPCR des marqueurs de différents types cellulaires : cellules souches (Lgr5), cellules absorbantes (Alpi, Epcam et Car2), cellules sécrétoires (Muc2, Lyz1, ChrgA et Pou2f3).
- Une analyse des différents marqueurs de la maturation intestinale a également pu être permise par RT-qPCR, permettant de définir si l'exposition gestationnelle accélère ou retarde celle-ci. Cette étude cible notamment l'expression des marqueurs intestinaux néonataux (Lct, Fcgrt, Prdm1 et Ass1) et des marqueurs intestinaux adultes (Sis, Treh et Arg2).

Une évaluation de la perméabilité intestinale du caecum, du colon proximal, et de l'iléon a également été réalisée par une analyse par RT-qPCR des marqueurs des différentes protéines impliquées dans les jonctions cellulaires : Occln pour les Occludines, Tjp1 pour les Zonula Occludens, et Cldn4 pour la famille des Claudines. La confirmation de la modulation génétique a été réalisée par Western-Blot dans l'iléon des souriceaux.

Enfin une analyse la composition du microbiote intestinal a été effectuée après récupération du contenu luminal du colon des souriceaux.

Cette étude a montré qu'une exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique type Pékin induit une microinflammation chez le mâle et la femelle. Le développement, la maturation intestinale et la composition microbienne sont également modifiées et ce particulièrement chez la femelle. La perméabilité iliaque est augmentée chez le mâle.

**A**



Gestation

Atmosphère  
type Pékin



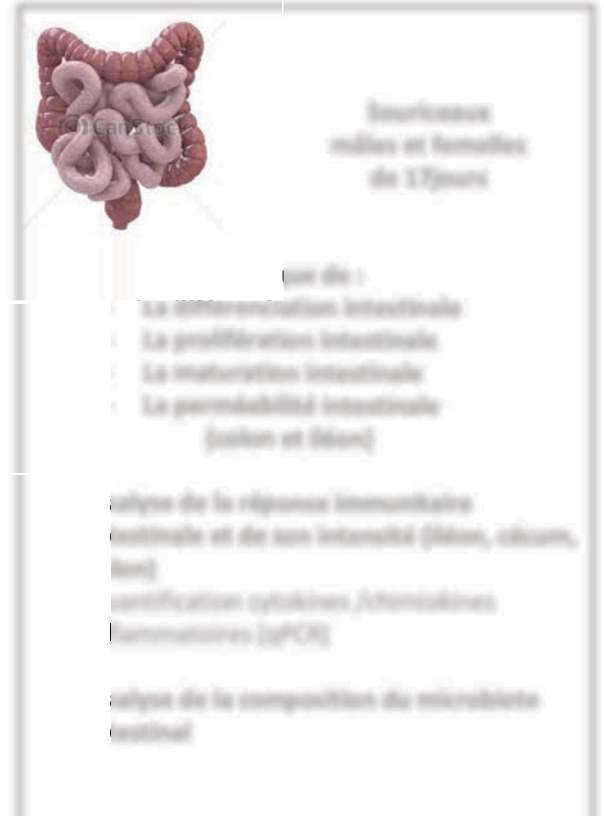
*Sacrifice des souriceaux  
mâles et femelles*



Pékin-filtré



*mâles et femelles*



**C**



de type Pékin sur le système immunitaire intestinal de la descendance **(A)**

Chambre expérimentale CESAM **(B)**

Armoire d'exposition des souris **(C)**

n=5 souris gestantes par cage, 4cages par conditions ; n=20souris gestantes CT , n=20 souris gestantes air pollué

1 **Title page**

2

3 Title: Murine *in utero* exposure to simulated complex urban air pollution disturbs offspring gut  
4 maturation and microbiota during intestinal suckling-to-weaning transition in a sex-dependent  
5 manner.

6

7 List the full names and institutional addresses for all authors

8 Eva Guilloteau<sup>1</sup>, Patrice Coll<sup>2</sup>, Zhuyi Lu<sup>3</sup>, Madjid Djouina<sup>1</sup>, Mathieu Cazaunau<sup>4</sup>, Christophe Waxin<sup>1</sup>,  
9 Antonin Bergé<sup>2</sup>, Ségolène Caboche<sup>5</sup>, Aline Gratien<sup>2</sup>, Elie Al Marj<sup>2</sup>, David Hot<sup>5</sup>, Laurent Dubuquoy<sup>1</sup>, David  
10 Launay<sup>1</sup>, Cécile Vignal<sup>1</sup>, Sophie Lanone<sup>3</sup>, Mathilde Body-Malapel<sup>1</sup>

11 1. Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in  
12 Inflammation, F-59000 Lille, France

13 2. Université de Paris and Univ Paris Est Creteil, CNRS, LISA, F-75013 Paris, France

14 3. Univ. Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, F-94010 Créteil, France

15 4. Univ. Paris Est Créteil and Université de Paris, CNRS, LISA, F-94010 Créteil, France

16 5. Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR2014-US41-PLBS-Plateformes  
17 Lilloises de Biologie & Santé, F-59000, Lille, France

18 Corresponding author: Mathilde Body-Malapel

19

20 **Abstract**

21 **Background:** Emerging data indicate that prenatal exposure to air pollution may lead to higher  
22 susceptibility to several non-communicable diseases. Limited research has been conducted due to  
23 difficulties in modelling realistic air pollution exposure. In this study, pregnant mice were exposed from  
24 gestational day 10 to 17 to an atmosphere representative of a 2017 pollution event in Beijing, China.

25 Intestinal homeostasis and microbiota were assessed in both male and female offspring during the  
26 suckling-to-weaning transition.

27 **Results:** Sex-specific differences were observed in progeny of gestationally-exposed mice. *In utero*  
28 exposed males exhibited decreased villus and crypt length, vacuolation abnormalities, and lower levels  
29 of tight junction protein ZO-1 in ileum. They showed an upregulation of absorptive cell markers and a  
30 downregulation of neonatal markers in colon. Cecum of *in utero* exposed male mice also presented a  
31 deeply unbalanced inflammatory pattern. By contrast, *in utero* exposed female mice displayed less  
32 severe intestinal alterations, but included dysregulated expression of *Lgr5* in colon, *Tjp1* in cecum, and  
33 *Epcam*, *Car2* and *Sis* in ileum. Moreover, exposed female mice showed dysbiosis characterized by a  
34 decreased weighted UniFrac  $\beta$ -diversity index, a higher abundance of *Bacteroidales* and  
35 *Coriobacteriales* orders, and a reduced *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio.

36 **Conclusion:** Prenatal realistic modelling of an urban air pollution event induced sex-specific precocious  
37 alterations of structural and immune intestinal development in mice.

38

39 **Keywords:** Air pollution. Gestational exposure. Intestinal development. Suckling-to-weaning  
40 transition. Microbiota. Maturation. Inflammation. Sex-specific.

41

## 42 **Background**

43 Air pollution has been estimated to be the single most important environmental health risk factor. It  
44 represents a greater disease burden than polluted water, soil contamination, and occupational  
45 exposures combined [1]. Air pollution causes a loss of life expectancy which rivals that of tobacco  
46 smoking [2]. It is well recognized as a major risk factor for many chronic non-communicable diseases  
47 such as cardiovascular, pulmonary and metabolic diseases [3–5]. Association studies also suggest a  
48 possible contribution of air pollution to the development of neurological illnesses such as Alzheimer’s  
49 disease [6], chronic kidney disease and renal function decline [7], liver cirrhosis [8], and autoimmune  
50 diseases. For the latter, epidemiological studies have shown a relationship between exposure to air



51 pollution and development and progression of multiple sclerosis [9], and exacerbation of rheumatoid  
52 disease [10] and systemic lupus erythematosus [11,12]. Furthermore, air pollution may also contribute  
53 to intestinal diseases [13,14].

54 There is a growing body of evidence which indicates that there is a prenatal window of susceptibility  
55 to adverse effects of air pollution. Exposure to air pollution early in life is directly linked to the  
56 development of major cardiovascular risks, including obesity, hypertension, and metabolic disorders  
57 [15,16]. Air pollution exposure *in utero* has been associated with childhood asthma and allergic  
58 diseases [17,18]. Regarding the intestinal tract, a population-based epidemiological study has  
59 highlighted that Ox exposure (as measured by redox-weighted oxidant capacity, a measure that takes  
60 into account the oxidative potential of both ozone (O<sub>3</sub>) and NO<sub>2</sub>) during the second trimester of  
61 pregnancy is associated with inflammatory bowel disease (IBD) development [19]. In mice, PM<sub>2.5</sub>  
62 exposure during gestation caused changes in the distribution and structure of gut microbiota of dams  
63 [20]. However, despite the emerging role of air pollution in intestinal pathologies, animal studies  
64 focusing on the intestinal burden induced by *in utero* exposure to air pollution are missing. Moreover,  
65 despite ambient air pollution consisting of both particulate matter (PM) and gaseous components  
66 including O<sub>3</sub>, volatile organic compounds (VOCs), carbon monoxide (CO), and nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>),  
67 realistic experimental studies that simulate complex air pollution are lacking. In this work, our  
68 hypothesis is that, in accordance with the developmental origins of health and disease (DOHAD)  
69 concept, air pollution exposure during gestation adversely affects the programming of intestinal  
70 homeostasis, which may favor the development of non-communicable chronic diseases in adulthood.  
71 We aimed to assess the early effects of gestational exposure to complex urban air pollution on  
72 intestinal tissues. For this purpose, a more representative atmospheric model, based on a 2017  
73 pollution event in Beijing, was generated (Fig S1)[21,22]. Pregnant mice were exposed to simulated  
74 Beijing-like air pollution from gestational day 10 (GD10) to GD17. Control mice were exposed to filtered  
75 Beijing-like air pollution during the same period. Effects of intrauterine exposure were assessed during  
76 the suckling-to-weaning transition (at postnatal day 17), which corresponds to a critical window for

77 both structural and immune intestinal development [23,24]. Throughout the study, we have evaluated  
78 the effects successively in the male progeny then in the female progeny, separately. These effects were  
79 assessed on four essential components of intestinal homeostasis: structural maturation, immune  
80 maturation, barrier function, and microbiota diversity and composition. In mice, as in humans, the  
81 neonatal intestine has several features that are distinct from adults. During the suckling-to-weaning  
82 period, gut growth and maturation accelerate involving both functional and structural changes in gut  
83 epithelium [25]. Thus, we first performed an overall assessment of the gut mucosal structure. The gut  
84 structural maturation was evaluated by measuring submucosa cellularity and mucosal surface area in  
85 proximal colon, and the villus length, depth, and villus/crypt ratio in ileum. Furthermore, during the  
86 suckling-to-weaning period, in small intestine, vacuolated fetal-type epithelium is replaced by non-  
87 vacuolated adult-type epithelium [25]. Since the ileum of postnatal day17 pups presented intense  
88 vacuolation of the villi, we developed a method for quantitative assessment of this vacuolation. Then,  
89 to further examine epithelium proliferation, immunohistochemical staining of the proliferative marker  
90 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) was performed. We analyzed the epithelium differentiation  
91 by quantifying was the levels of several markers of intestinal cells: The leucine-rich-repeat-containing  
92 G-protein-coupled receptor 5 (*Lgr5*), the best described intestinal stem cell marker; the markers of  
93 absorptive cells alkaline phosphatase, intestinal (*Alpi*), epithelial cell adhesion molecule (*Epcam*), and  
94 carbonic anhydrase 2 (*Car2*); the markers of secretory cells namely mucin 2 (*Muc2*) for goblet cells,  
95 lysozyme 1 (*Lyz1*) for Paneth cells, chromogranin A (*ChrgA*) for enterochromaffin cells and POU  
96 domain, class 2, transcription factor 3 (*Pou2f3*) for tuft cells. To better assess the functional maturation  
97 of the epithelium, we quantified the levels of certain enzymes representative of neonatal epithelium  
98 or adult epithelium. During the suckling period, neonatal intestinal cells express disaccharidase lactase-  
99 phlorizin hydrolase (*Lct*) to digest milk lactose [1]. After the suckling period, enterocytes adapt to digest  
100 solid food that is rich in complex carbohydrates and low in fat. This is manifested by a switch in brush  
101 border disaccharidase expression from lactase to sucrase isomaltase (*Sis*) and trehalase (*Treh*) [2].  
102 Furthermore, another metabolic switch is related to the low concentration of arginine in milk. To

103 provide for the need for arginine, neonatal enterocytes express the rate limiting enzyme in arginine  
104 biosynthesis, argininosuccinate synthase-1 (*Ass1*) [3]. In contrast, adult enterocytes express arginase  
105 2 (*Arg2*), an enzyme capable of catabolizing arginine that is abundant in solid foods. Furthermore, the  
106 neonatal intestinal epithelium expresses the neonatal Fc fragment of the IgG receptor and transporter  
107 (*Fcgrt*, also called *FcRn*), which mediates absorption of maternal IgG from milk into the bloodstream  
108 [26]. The expression of *Fcgrt* declines significantly during the suckling-to-weaning transition [24].  
109 Similarly, the expression of *Prdm1* (PR domain containing 1, with ZNF domain; also called *Blimp-1*, or  
110 B lymphocyte-induced maturation protein-1) is lost at the suckling-to-weaning transition [27,28].  
111 The assessment of gut immune maturation was based on quantification of transcription factors and  
112 inflammatory cytokines representative of the Th1, Th2, Th17, and Treg immune response. For gut  
113 barrier function, we measured the levels of 3 markers of intestinal permeability, occludin (*Ocln*), tight  
114 junction protein-1 (*Tjp1*; coding for zonula occludin 1 protein), and claudin-4 (*Cldn4*). Finally,

## 115 **Results**

116 Gestational exposure to Beijing -like air did not change litter size (Fig S2 A,  $p=0.9$ ), offspring sex  
117 distribution (Fig S2 B,  $p=0.3$ , Fisher's exact test), dam body weight (Fig S2 C,  $p=0.5$ ). Notably, body  
118 weight of offspring at termination PND17 were similar between control air and Beijing-like air exposed  
119 pups (Fig S2 D,  $p=0.3$ ).

## 120 **Histomorphological analysis in male mice**

121 As a first assessment of gut mucosal structure, May Grünwald Giemsa (MGG)-stained sections of male  
122 colon and ileum were analyzed (Fig 1 A and D). In colon, the cell number in the submucosa and the  
123 mucosal surface area were measured (Fig 1 B and C). No variation was evident. In ileum, the villus  
124 length and the crypt depth were measured (Fig 1 E and F). They were both significantly decreased in  
125 Beijing-like air exposed mice compared to control air mice. The villus/crypt ratio did not vary (Fig 1G).  
126 The number of vacuoles per villi was determined and did not show variation between the 2 groups of  
127 mice (Fig 1H). The mean vacuolated area per villus was significantly reduced in Beijing-like air exposed  
128 mice (Fig 1I). Morphometric evaluation of the vacuoles also showed significant variations (Fig 1 J and

129 K). In pups exposed *in utero* to air pollution, the vacuole circularity index was increased and the mean  
130 eccentricity index was decreased compared to control pups. Therefore, in males, postnatal exposure  
131 to air pollution induced histomorphological alterations in ileum, and notable disturbances of the  
132 vacuolation process.

133

#### 134 **Histomorphological analysis in female mice**

135 We performed the same analyses in colon and ileum of female pups. In colon, the mucosal surface  
136 area and the submucosa cellularity did not show significant variation between air pollution- and  
137 control-exposed mice (Fig 2A, B, C). In ileum, there were no modification of the crypt depth, villus  
138 length, and villus/crypt ratio (Fig 2D, E, F, G). The morphometric analyses of the vacuoles showed no  
139 differences between the female pups *in utero* exposed to simulated Beijing-like polluted air compared  
140 to female control pups. Therefore, in females, no important histological impairments of colon and  
141 ileum were induced by the postnatal exposure of simulated Beijing-like air pollution.

142

#### 143 **Epithelium proliferation, differentiation, and maturation in male mice**

144 In male colon, the number of cells positive for the proliferative marker PCNA was counted and was  
145 similar between the polluted air- and the control air-exposed mice (Fig 3 A and B). Transcript levels of  
146 several markers of intestinal cells were quantified by real-time polymerase chain reaction (PCR). The  
147 levels of the intestinal stem cell marker *Lgr5* did not show significant variation (Fig 3C). The 3 markers  
148 of absorptive cells, *Alpi*, *Epcam* and *Car2* were all significantly upregulated in Beijing-like air exposed  
149 mice compared to control air mice (Fig 3D). The marker of goblet cells mucin 2 (*Muc2*) was significantly  
150 downregulated in Beijing-like air exposed mice (Fig 3E). The transcript levels of the markers of Paneth  
151 cells, *Lyz1*, of enterochromaffin cells, *ChrgA*, and of tuft cells *Pou2f3*, were not changed between the  
152 2 groups of mice.

153 To assess the functional maturation of gut epithelium, we quantified mRNA levels of several neonatal  
154 and adult markers in colon of Beijing-like air exposed mice compared to control air mice (Fig 3 F and

6



155 G) [24]. In accordance with the physiological metabolic switch occurring after the suckling period in  
156 order to digest solid food instead of milk, expression of *Lct* was downregulated, and expression of *Sis*  
157 was upregulated; however, the expression of *Treh* was unchanged. Colon expression of *Ass1* and *Arg2*  
158 were lower in mice exposed *in utero* to Beijing-like air pollution as compared with mice exposed to  
159 control air pollution. Neonatal marker *Prdm1* expression was not modified but the one of *Fcgrt* was  
160 significantly reduced in colon after Beijing-like air pollution exposure.

161 In ileum, the number of PCNA-positive cells was higher in Beijing-like air exposed mice compared to  
162 control air mice, reflecting an increase of epithelial proliferation in these mice (Fig 3 H and I). The mRNA  
163 levels of the markers of stem, absorptive, and secretory cells were not modified (Fig 3 J-L). Moreover,  
164 there was no variation of expression of the neonatal and adult genes (Fig 3 M and N).

165 Altogether, these results tend to show that postnatal exposure to simulated Beijing-like air pollution  
166 in male pups led to alterations of differentiation and maturation biomarkers in colon epithelial cells,  
167 as well as to an increase of epithelial proliferation in ileum.

168

#### 169 **Epithelium proliferation, differentiation, and maturation in female mice**

170 In females, PCNA immunostaining of colon showed no significant modification of proliferation in  
171 Beijing-like air exposed mice compared to control air mice (Fig 4 A and B). The mRNA level of *Lgr5* was  
172 significantly downregulated in Beijing-like air exposed mice (Fig 4C). The transcript abundance of  
173 absorptive and secretory cell markers did not show significant variation (Fig 4 D and E). The neonatal  
174 markers were not changed either (Fig 4F). The transcription of *Arg2* was significantly downregulated  
175 in Beijing-like air exposed mice compared to control air mice (Fig 4G).

176 In ileum, PCNA staining was similar between the Beijing-like air exposed mice and the control air mice  
177 (Fig 4 H and I). The level of *Lgr5* was also unchanged (Fig 4J). The expression of absorptive cell markers  
178 *Epcam* and *Car2* were upregulated in Beijing-like air exposed mice (Fig 4K). Among the secretory cell  
179 markers, a relative over-expression of *ChrgA* transcripts was quantified in Beijing-like air exposed mice  
180 as compared with control air mice (Fig 4L). The maturation of ileal tissue was weakly altered, and an

7

181 upregulation of *Sis* expression was detected in Beijing-like air exposed mice (Fig 4 M and N). Because  
182 over-expression of *ChgrA* in Beijing-like air-exposed mice ileum was observed, we quantified  
183 expression of other markers of enteroendocrine cells. Levels of tachykinin 1 (*Tac1*, or substance P)-  
184 producing enterochromaffin cells, glucagon (*Gcg*)- and peptide YY (*Pyy*)-expressing L cells, gastric  
185 inhibitory protein (*Gip*)-producing K cells, neurotensin (*Nts*)- and neuromedin-producing N cells, and  
186 secretin (*Sct*)-producing S cells were quantified [29] (Fig S3). An upregulation of *Nts* was found in the  
187 Beijing-like air-polluted group, reflecting an abnormal expression of neurotensin.

188

#### 189 **Inflammatory pattern in male mice**

190 In order to assess whether *in utero* exposure to air pollution induces impairments of the inflammatory  
191 process in postnatal day 17 pups, we quantified mRNA levels of transcription factors and inflammatory  
192 cytokines representative of the Th1, Th2, Th17, and Treg immune response. In proximal colon,  
193 expression of the immunomodulatory cytokine *Il10* was strongly enhanced in Beijing-like air pups  
194 compared to control air pups (Fig 5A). In cecum, the Th1 transcription factor *Tbx21* (also called *T-bet*)  
195 was significantly higher in Beijing-like air exposed mice compared to control mice (Fig 5B). The Th2  
196 cytokines *Il4* and *Il5* were also upregulated in Beijing-like air pups. The Th17 transcription factor *Rorc*  
197 was upregulated and the levels of *Il17a* and *Il22* were downregulated in Beijing-like air exposed mice  
198 compared to control air mice. Levels of *Tgfβ* were also lower in cecum of Beijing-like air exposed mice.  
199 In ileum, a significant upregulation of *Rorc* was induced by *in utero* exposure of simulated Beijing-like  
200 air pollution (Fig 5C).

201

#### 202 **Inflammatory pattern in female mice**

203 In proximal colon of female mice, the transcript levels of *Il13* and *Il10* cytokines were greatly  
204 upregulated in Beijing-like air exposed mice compared to control air mice (Fig 6A). In addition, the  
205 mRNA expression of *Il4* was enhanced in cecum by *in utero* Beijing-like air exposure (Fig 6B). None of  
206 the other markers studied were modified in ileum (Fig 6C).

207

**208 Intestinal permeability markers in male and female mice**

209 We assessed whether *in utero* exposure to air pollution disrupts the intestinal barrier. . In male  
210 proximal colon there was no significant expression variation of the 3 markers of intestinal permeability,  
211 *Ocln*, *Tjp1*, and *Cldn4* (Fig 7A). In cecum of Beijing-like air-exposed males, we observed an upregulation  
212 of *Ocln* and a downregulation of *Tjp1* and *Cldn4* transcripts. *Tjp1* expression was also strongly reduced  
213 in the ileum of males exposed to Beijing-like air. In females, *in utero* Beijing-like air pollution exposure  
214 induced an upregulation of *Cldn4* and *Tjp1* in proximal colon and cecum, respectively (Fig 7B).  
215 Furthermore, in order to confirm the relevancy of the strong decrease of *Tjp1* transcript expression in  
216 male ileum, we quantified the expression of ZO-1 protein by western blot and confirmed that ZO-1  
217 protein levels were significantly reduced in ileum of male mice exposed *in utero* to Beijing-like air  
218 pollution compared to control air mice (Fig 7 C and D).

219

**220 Microbiota DNA extraction and 16S rDNA gene amplicon sequencing analysis**

221 To assess the impact of *in utero* exposure to air pollution on colon luminal bacterial content, we  
222 sequenced V3-V4 amplicons of 16S rRNA genes. After a denoising step performed with DADA2  
223 software, we obtained a total of 884,707 reads. Exposure to air pollution did not significantly affect  $\alpha$ -  
224 diversity (Chao1 diversity index, Fig 8A; Evenness and Simpson indices, Fig S4). The weighted UniFrac  
225  $\beta$ -diversity index showed no significant difference in males, but a significant decrease in females  
226 ( $p=0.011$ ; Fig 8B). After taxonomic assignment of amplicon sequence variants (ASVs), the effect of *in*  
227 *utero* air pollution exposure on the abundance of phyla was assessed. Taxonomic assignment at the  
228 phylum level of ASVs, with each color representing an individual bacterial phylum, is shown in Fig 8C.  
229 Bacterial composition was dominated by members of the *Bacteroidetes* phylum followed by  
230 *Firmicutes*, although mice presented important interindividual variations. A high abundance of  
231 *Verrucomicrobia* was found in only 4 control male and 2 control female mice, but no phylum was found  
232 to be significantly different between the exposed and control mice. Similarly, analyses at the class level

9

233 showed important interindividual variability, but did not reveal significant variations between air  
234 pollution- and control-exposed groups (data not shown). At the order level, the main bacteria were  
235 *Bacteroidales*, *Clostridiales*, and *Lactobacillales* (Fig 8D). In males, no bacterial order was found to vary  
236 significantly following air pollution gestational exposure. By contrast, *Bacteroidales* and  
237 *Coriobacteriales* orders were significantly more abundant in Beijing-like air-exposed mice than in  
238 control air-exposed female mice ( $p=0.001$  and  $p=0.04$ , respectively; Fig 8E). Moreover, the  
239 *Firmicutes/Bacteroides* ratio, which is a widely used marker of intestinal dysbiosis, was calculated and  
240 found to be significantly reduced in females after *in utero* exposure to Beijing-like air (Fig 8F).

241

## 242 **Discussion**

243 Although exposure to air pollution during pregnancy is linked to high risk of adverse pregnancy  
244 outcomes and long-term postnatal health, limited mechanistic data exists to assess these impacts  
245 under controlled exposure conditions. This limitation of our knowledge is mainly attributed to the  
246 complexity of the polluted atmosphere, and to the great difficulty in modelling the impact of realistic  
247 exposures. Using CESAM, an atmospheric simulation chamber, we have capitalized on a totally  
248 innovative platform for exposing mice to more realistic atmospheric conditions. Among the  
249 constituents of air pollution associated with deleterious effects on health, we considered gaseous  
250 pollutants ( $O_3$ ,  $SO_2$ , CO, NOx, and VOCs) and particles ( $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$ , and ultrafine PM). In order to  
251 simulate atmospheric mixtures in all their complexity in the laboratory, environmental chemists have  
252 developed photo-reactors that are equipped to reproduce and control atmospheric processes such as  
253 solar radiation, concentrations of species, and the timely injection of aerosols and gases. These  
254 atmospheric simulation chambers thus offer the possibility of studying the myriad of products resulting  
255 from the atmospheric oxidation of primary compounds [30].

256 This innovative experimental approach allowed us to mimic the effects of “real life” exposure of urban  
257 air pollution on the suckling-to-weaning intestinal tissues. In mice intestinal development begins right  
258 before birth and intestinal maturation is completed at approximately 3 weeks postnatally during the

10



259 suckling-to-weaning transition [31]. In female offspring, *in utero* exposure to Beijing-like air pollution  
260 induced mild modifications of intestinal development. Enhanced expression of *Epcam* and *Car2*  
261 absorptive epithelial cell markers and *ChrgA* enteroendocrine cell marker were observed in small  
262 intestine. In colon, the only alterations were decreased expression of *Lgr5* stem cell marker and *Arg2*  
263 adult epithelial cell marker. Therefore, our results argue in favor of weak effects of postnatal air  
264 pollution exposure on intestinal differentiation and maturation in female young offspring. By contrast,  
265 in males, several parameters of intestinal development were affected by air pollution exposure.. In  
266 colon, the 4 neonatal markers studied were found downregulated in Beijing air exposed mice, but less  
267 consistency was observed for the adult markers. It is likely that the development of some epithelial  
268 functions is disturbed in male colon, and further studies should be conducted in order to identify them.  
269 Besides, in male small intestine, both the villus length and the crypt depth were reduced. This was  
270 associated with increased epithelial proliferation, as well as decreased size and morphological  
271 alterations of the vacuoles. This latter observation may reflect a trend to replacement of vacuolated  
272 fetal-type epithelium with non-vacuolated adult-type epithelium and therefore more precocious  
273 maturation in *in utero* pollution-exposed mice. However, the markers of neonatal cells were not  
274 changed, indicating the absence of a functional impact of exposure to air pollution on intestinal  
275 maturation on the parameters studied. Therefore, these results suggest that in males, *in utero*  
276 exposure to air pollution would promote only partially some physiological processes of small intestinal  
277 maturation. Moreover, our results show that *in utero* exposure to Beijing-like air pollution led to  
278 disturbances of proliferation processes. It is known that villus and crypt morphogenesis occurs during  
279 embryogenesis and postnatally, respectively; crypts are the architectural unit of the stem cell niche  
280 [32]. Villus and crypt morphogenesis are complex processes which are essential for normal intestinal  
281 physiology. A precedent for imprinting of skin epithelial stem cells has been reported [33]. Therefore,  
282 the abnormalities observed in male small intestine may reflect disorders of intestinal development  
283 which deserve further study.

284 We also studied whether *in utero* air pollution exposure could affect the maturation of the immune  
285 system. The expression of the immunomodulatory cytokine IL-10 was exacerbated in colon by *in utero*  
286 exposure to Beijing-like air, both in males and females. In neonates, as in adults, IL-10 can have anti-  
287 inflammatory properties and can be produced by macrophages and T cells [34]. IL-10R signaling in  
288 macrophages is pivotal in confining a microbiota-driven inflammatory response beginning at the third  
289 week of life [35]. IL-10 can also be produced by neonatal type 1 conventional dendritic cells (cDC1)  
290 before their differentiation into IL-12p40-producing cDC1 [36]. Therefore, if IL-10 overexpression  
291 derives from cDC1, it could reflect a defect in maturation of these cells. Apart from this finding, the  
292 cytokine profile in the colon was not altered. In ileum, the cytokine pattern was very similar between  
293 Beijing-like air exposed mice and control air exposed mice. By contrast, in cecum, and only in males,  
294 we observed an increase of 2 major immune transcription factors (*Tbx21* and *Rorc*), an overexpression  
295 of Th2 cytokines (*Il4* and *Il5*), and decreased expression of cytokines *Il17a*, *Il22*, and *Tgfb*. These  
296 alterations are numerous but they do not make it possible to demonstrate a clear defect in the immune  
297 response. Association of the upregulation of Th17 transcription factor *Rorc* and downregulation of  
298 Th17 cytokines *Il17a* and *Il22* is paradoxical, and to date the data in the literature is not sufficient to  
299 fully explain this apparent discrepancy. It is known that immune homeostasis in the gut is normally  
300 maintained by the production of low levels of IL-17A and IL-22 by resident Th17 lymphocytes [37] and  
301 ILC3 [38]. In neonates IL-17A can also be produced by  $\gamma\delta$ T cells and has an essential role in host defense  
302 against *C.difficile* infection [39].

303 Another important parameter of intestinal immune response is the development of an efficient  
304 mucosal barrier including a tailored regulation of tight junctions which seal the epithelial cell-cell  
305 contacts and regulate the paracellular passage of solutes [40]. The modifications of permeability  
306 markers that we observed, particularly downregulation of ZO-1 at the transcript and protein levels in  
307 male ileum, could lead to a gut barrier defect. The leakiness of the gut epithelium has been associated  
308 with the development of allergic and autoimmune diseases, especially when it is associated with a  
309 dysbiotic microbiota that cross the damaged barrier [41].

310 From birth, the normal gut microbiota contributes to the development of gut function, educates the  
311 immune system, contributes to the regulation and maintenance of intestinal barrier function, provides  
312 protection against infection, and promotes tolerance of foods. In addition, the early life microbiota has  
313 a crucial role in the risk of acquiring diseases such as asthma, atopic dermatitis, diabetes, allergic  
314 diseases, obesity, cardiovascular diseases, and neurological disorders [42]. In our study, *in utero*  
315 exposure to air pollution did not modify the  $\alpha$ -diversity (within sample diversity) and especially the  
316 Chao1 species richness index, indicating that the number of different species was similar between the  
317 groups. By contrast, and only in females, the bacterial composition showed few significant variations.  
318 At the phylum level, the ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* was reduced. In adults, this ratio is a hallmark  
319 of low-grade inflammation [43]. It has also been proposed as a marker of intestinal maturation during  
320 aging (in the second year of adulthood) [44]. In female mice exposed *in utero* to air pollution, the  
321 relative abundance of *Coriobacteriales* was higher. This order is reduced in colitic mice [45] and  
322 enriched in acute liver failure [46]. By contrast, *Coriobacteriales* are more abundant in diseased  
323 mucosal ileum tissues from Crohn's disease patients compared to control mucosa from non-IBD  
324 patients [47]. *Coriobacteriales* are also more abundant in fecal microbiota of multiple sclerosis patients  
325 [48]. Moreover, female mice exposed *in utero* to air pollution presented higher abundance of  
326 *Bacteroidales*. The *Bacteroidales* (or S24-7 family) are numerically dominant intestinal organisms that  
327 associate with the mucosal surface and have properties that both positively and negatively affect the  
328 host. The *Bacteroidales* showed a higher abundance in dextran sulfate sodium-induced mice [45,49].  
329 In adult mice, bacteria from the order *Bacteroidales* are sufficient to promote appearance of  
330 intraepithelial lymphocytes in the colon, which are important for the maintenance of a healthy  
331 intestinal barrier [50]. In humans, *Bacteroidales* produce bacteroidetocins, a family of broad-spectrum  
332 peptide toxins that kill members of the *Bacteroidetes* phylum, including *Bacteroides*, *Parabacteroides*,  
333 and *Prevotella* gut species, as well as pathogenic *Prevotella* species [51]. A decrease in adherent  
334 *Bacteroidales* diversity (i.e., the number of different *Bacteroides* species per biopsy) has been found at  
335 sites with increased inflammation in IBD subjects [52]. Therefore, current knowledge shows that

336 bacteria of the orders *Bacteroidales* and *Coriobacteriales* have a role in the regulation of intestinal  
337 homeostasis and are deregulated in certain pathological conditions, but this does not allow us to  
338 predict the consequences of their deregulation in females having been exposed *in utero* to air  
339 pollution.

340 Most of the effects that we observed in the gut as consequences of maternal air pollution exposure  
341 are sex-specific. This gender dependency is a classical feature of air pollution impact. For instance,  
342 prenatal air pollution exposure has been shown to “program” offspring for increased susceptibility to  
343 diet-induced weight gain and neuroinflammation in adulthood in a sex-specific manner [53].  
344 Moreover, the effects induced on the immune system of offspring by maternal exposure to diesel  
345 exhaust particles (DEP) are also sex-dependent. Indeed, exposure to DEP *in utero* decreased the  
346 frequency of CD1d<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup> B cells in female mice and IFN- $\gamma$  production by splenocytes in both sexes.  
347 Male mice had elevations in macrophage and lymphocyte numbers in response to DEP whereas female  
348 mice only had elevated IL-6, MCP-1, and MIP-2 levels [54]. Epidemiological studies have also  
349 highlighted gender-specific effects of air pollution on respiratory health. Overall, studies of children  
350 suggest stronger effects among boys in early life and among girls in later childhood [55].

351 Despite accumulating evidence of sex-dependent adverse effects of maternal air pollution exposure,  
352 the mechanisms involved are only now starting to be identified. Firstly, prenatal air pollution exposure  
353 induces epigenetic modifications in placenta and in cord blood. Notably, ambient PM causes significant  
354 epigenomic changes, including alterations in DNA methylation, miRNA regulation, and histone  
355 modifications. Birth cohort studies have shown that PM<sub>2.5</sub> exposure during the last trimester of  
356 pregnancy was positively associated with placental methylation of the promoter regions of regulatory  
357 genes in the circadian pathway and key DNA repair genes [56]. PM<sub>10</sub> exposure during the first 2  
358 trimesters of pregnancy was positively associated with placental methylation of HSD11B2 (i.e., genes  
359 involved in the glucocorticoid metabolism and fetal growth). Moreover, specific PM<sub>2.5</sub> pollution  
360 exposure windows were associated with altered placental miR-20a, miR-21, miR-146a, and miR-222  
361 expression [57]. Also, prenatal PM<sub>2.5</sub> exposure was positively associated with cord plasma histone H3



362 modifications [58]. This altered biomolecular functioning of the placenta may contribute to early and  
363 even later-life health consequences.

364 It is also worth mentioning that others mechanisms, themselves potentially mediated by the epigenetic  
365 modifications described above, could also contribute to the gender dependency of air pollution impact.  
366 Placental structure and function, as well as feto-placental transcriptome are known to be different  
367 between males and females[59]. It has been hypothesised that these differences led to sex-dependent  
368 fetus adaptation of *in utero* environment: males would be less adaptable to shifts in the *in utero*  
369 environment, which then places them at a greater risk for intrauterine morbidities or mortality.  
370 Comparatively, females would be more adaptable to changes in the *in utero* environment at the cost  
371 of growth, which may reduce their risk of poor perinatal outcomes. In our study, the *in utero* pollution  
372 was not toxic enough to cause a body weight loss, but the sex-specific differences of feto-placental  
373 adaptability were likely to be involved in the gender dependency of the effects observed on the  
374 intestinal tract.

375 Moreover, sex-specific effects affecting other organs could also contribute to the gender dependency  
376 of intestinal tract response, through disruption of the critical physiological interconnexion between  
377 the gut and these organs. Indeed, it has been reported that, following murine *in utero* exposure to  
378 carbon black particles, liver of male offspring showed selective altered expression in genes belonging  
379 to inflammatory, respiratory and nutritional diseases, and genes in female offspring liver were  
380 associated mainly with metabolic disease and endocrine systems disorders at postnatal day 2 [58].  
381 Such sex-specific liver disturbances could affect the intestinal tract through impairments of the gut-  
382 liver axis [60]. Furthermore, rat prenatal exposure to DEP has been shown to alter microglial  
383 development in a more pronounced manner in males than in females [61], which paves the way to  
384 possible disturbances of bidirectional gut–brain interactions [62]. Similarly, fetal exposure to air  
385 pollution induce lung developmental defects [63], which could impact the key gut-lung axis [64].

386

387 **Conclusions**

388 In mice, postnatal exposure to simulated Beijing-like air pollution induced sex-specific effects on  
389 intestinal proliferation, maturation, permeability, immune response, and microbiota composition (Fig  
390 S5). According to the “Developmental Origins of Health and Disease” (DOHaD) concept, early-life  
391 alterations induced by intrauterine pollutant exposure may have long-term effects influencing  
392 offspring susceptibility to diseases later in adulthood. Therefore, precocious disturbances that we  
393 observed in intestinal development following prenatal exposure to air pollution may underlie a higher  
394 susceptibility for developing diseases later in life.

395

## 396 **Methods**

### 397 **Generation of complex air pollution**

398 The innovative approach developed for this study was to realistically simulate the atmospheric mixture  
399 in its whole complexity, while maintaining the ability to control, reproduce, and fully characterize the  
400 experimental conditions. The CESAM chamber (described at <https://cesam.cnrs.fr/>; a 4.2 m<sup>3</sup> stainless  
401 steel atmospheric simulation chamber; evacuable down to a few 10<sup>-7</sup> atm; temperature controlled  
402 between +15°C and +60°C) was used to study the myriad of products arising from the atmospheric  
403 oxidation of primary organic compounds. The experimental protocol included a continuous injection  
404 of relevant mixtures of primary pollutants (mainly nitrogen oxides, organic compounds from a  
405 representative mix of anthropogenic emissions, sulphur dioxide, soot, inorganic salts, and mineral dust  
406 particles from the Gobi Desert to simulate a Beijing-like atmosphere from 2017) at low concentrations  
407 (ppb levels) in air with the CESAM simulation chamber operating as a slow flow reactor (Fig S6). The  
408 residence time of simulated air parcels in the experimental volume was fixed to 4 h in order to  
409 represent air masses of regional scale. During this time the synthetic mixture was exposed to artificial  
410 solar irradiation, allowing secondary pollutants such as O<sub>3</sub>, nitric acid, formaldehyde, peroxyacetyl  
411 nitrates (PANs) as well as complex polyfunctional organics including secondary organic aerosols, to be  
412 produced and to reach their chemical steady state. Mice were exposed to constant flows of this  
413 mixture (Fig S1).

16

**414 Simulated atmospheric environment at the laboratory**

415 The 2017 China smog event was an extreme air pollution episode that affected East China, initiated by  
416 slow air carrying industrial emissions and meteorological conditions, that took place in December of  
417 that year. High levels of  $PM_{2.5}$  (generated from coal combustion and industrial sources) and low  
418 visibility were observed, leading to the closure of airports, highways, and schools [21,22,65]. For the  
419 simulation of a Beijing-like atmosphere, VOCs were introduced into the atmospheric chamber as  
420 precursors, which were the most abundant and commonly emitted particulates in the urban  
421 atmosphere of Beijing at the time: isopentane (alkane), propene (alkene), acetylene (alkyne),  
422 acetaldehyde (aldehyde), benzene, toluene, and m,p-xylene (aromatic hydrocarbons). The  
423 concentrations were determined in order to have stable levels of pollutants in the chamber, and  
424 representative of the pollution episode [30]. By the end of 20 h of VOC injection, nitrogen monoxide  
425 (NO) was introduced in the chamber and then the lights were turned on, simulating the sunlight  
426 irradiation in the troposphere. Additionally, seeds of ammonium sulfate particles were injected in the  
427 chamber. They formed contact surfaces for the condensation of oxidized products resulting in the  
428 formation of secondary organic aerosols. These particles were produced from the nebulization of an  
429 ammonium sulfate solution through an atomizer. In order to realistically simulate an atmosphere  
430 representative of Beijing, soot particles were generated using a soot generator (miniCAST Series 5200,  
431 which produces combustion soot particles by using a well-defined flame that simulates the combustion  
432 in modern combustion engines), based on the combustion of propane. These particles were  
433 transferred into a smaller chamber (soot reservoir chamber) and were injected once a day into the  
434 CESAM chamber. Moreover, also within 1 hour once a day, mineral dust particles were injected,  
435 produced through a shaking process from a Gobi Desert sample, into the chamber (simulating a desert  
436 storm that impacted Beijing with a mineral dust plume). The maximum PM concentration during the  
437 experimental campaign was  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Fig S7).

438 The atmosphere was monitored by several instruments, including a NOx analyser (chemiluminescence,  
439 Horiba APNA370) coupled with a NO<sub>2</sub> analyser (Teledyne T500U), an O<sub>3</sub> analyser (UV spectroscopy,

440 Horiba APOA370), a SO<sub>2</sub> analyser (Horiba APSA370), an in-situ FTIR (Bruker Tensor 37), and for the  
 441 particulate matter a SMPS (TSI 3080 + TSI3025), a Light-scattering aerosol (Palas Welas Digital 2000)  
 442 and an Aerosol Chemical Speciation Monitor (Aerodyne) for aerosol speciation.

443 Table 1 gives an overview of the pollutants defined as reference to qualify a “Beijing-like” atmosphere  
 444 simulation. This shows how the atmospheric environment to which the mice were exposed is complex  
 445 (tens of pollutants, both in aerosol and gaseous phases), and representative of the urban situation of  
 446 Beijing in December 2017 (most of the reference pollutants are present in a relative abundance that is  
 447 similar to the targeted range) [21,22].

448

449

	Pollutants or components	Observed mean concentration	
Gaseous Pollutants	Ozone - O <sub>3</sub> (ppb)	6.34 ± 3.59	
	Nitrogen monoxide - NO (ppb)	2.98 ± 2.19	
	Nitrogen dioxide - NO <sub>2</sub> (ppb)	10.33 ± 4.56	
	Sulfur dioxide - SO <sub>2</sub> (ppb)	5.11 ± 2.65	
Particulate Pollutants	<b>PM<sub>2.5</sub></b>		
	Particle number concentration (part/cm <sup>3</sup> )	2 000 - 10 000	
	Particle mass concentration (µg/m <sup>3</sup> )	105.46 ± 50.34	
	<b>Aerosol chemical composition indicators</b>		
	Sulfates (µg/m <sup>3</sup> )	5 - 8	
	Nitrates (µg/m <sup>3</sup> )	5 - 10	
	Ammonium (µg/m <sup>3</sup> )	3 - 7	
	Organic carbon (OC) (µg/m <sup>3</sup> )	15 - 25	
Black carbon (BC) (µg/m <sup>3</sup> )	3 - 5		
Gaseous Pollutants	Formaldehyde - HCHO	Identified by PTR-MS	
	Acetaldehyde - CH <sub>3</sub> CHO	Identified by PTR-MS	
	Acetone - C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Identified by PTR-MS	
	Methylglyoxal or 2-oxopropanal - C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Identified by PTR-MS	
	Glyoxal or ethanedial - CHOCHO	Identified by PTR-MS	

450



451 **Table 1:** Expected and observed ranges of December 2017 “Beijing-like” atmospheric pollutants.

452

#### 453 **Experimental design**

454 Forty pregnant C57/BL6J mice arrived from Janvier Labs at GD9. They were directly settled in cages  
455 (TECNIPLAST, France) containing bedding (ASPEN, France) and nesting materials (SERLAB, France) as  
456 well as shredded filter papers (UNIQUESE, France). Each cage hosted 5 mice and each compartment  
457 (Control air or Pollution) of the cabinet accommodates 4 cages (20 pregnant mice per exposure  
458 condition). All the pregnant mice had free access to diet (SSNIFF, Germany Ref S9343-S403) and sterile  
459 tap water. In both compartments, the ambient temperature was controlled between 22°C and 25°C,  
460 with a humidity from 30% to 50% and a 12 h/12 h light/dark cycle. Surveillance cameras were installed  
461 inside the cabinet to observe the behaviour and check the status of the mice during the whole  
462 exposure period (whole body).

463 Exposure to air pollution occurred for 7 consecutive days, from GD9 to GD16. At the end of the  
464 exposure period, mice were transferred to the animal facility and placed individually into new cages,  
465 containing a shelter for mice (SERLAB, France), shredded filter paper (UNIQUESE, France) and nesting  
466 material (SERLAB, France). Free access to diet (SSNIFF, Germany Ref S9343-S403) and tap water were  
467 also provided to each cage. The delivery occurred between GD19 and GD21. Male and female offspring  
468 was sacrificed on the 17th day of life. One male and one female per cage were chosen randomly among  
469 the offspring. For each study and each condition, a total of 10 males and 10 females were chosen  
470 Intestinal tissues were sampled for histological and molecular biology analyses. The study was carried  
471 out in accordance with INSERM recommendations on the treatment of animals and was approved by  
472 the ethics committee of the University of Paris-Est Créteil Val de Marne (APAFIS N °:  
473 2017113013439718; N ° of Notice: 12/12 / 17-7).

#### 474 **Histological analysis and image processing**

475 Proximal colon and ileum were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, processed, and embedded in  
476 paraffin wax by an automatic sample preparation system (LOGOS One, Milestone). Serial histological

19

477 sections of 4  $\mu\text{m}$  thickness were cut, deparaffinized, rehydrated, and stained with MGG (Carlo Erba  
478 reagents, Val de Reuil, France, ref. E460583 and E453612). Images were acquired with a DM5500B  
479 microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) and intestinal layers were photographed at a  
480 magnification of 20x. Histomorphometric analyses were performed using Image J software.  
481 Submucosal cellularity and mucosal surface area in the colon were measured, as well as villus height  
482 and crypt depth in the ileum. At least 100 well-oriented mucosa, villi, and crypts were measured in at  
483 least 5 individual mice from each group. For vacuole morphologic analyses, an image processing  
484 algorithm developed by Lustig *et al.* was adapted [66]. This algorithm converts a microscope image  
485 from a red-green-blue image to a grayscale image: the vacuoles are colored white and all other  
486 components are blackened. Based on the overlay of the binary image and the grayscale-processed  
487 image, we selected clearly visible vacuoles and Image J allowed the measurement of 1) vacuole  
488 number; 2) vacuole area, automatically calculated in pixels and converted to  $\mu\text{m}^2$ ; 3) vacuole  
489 circularity, a measurement of how closely the shape of the vacuoles approaches that of a circle  
490 (circularity can be valued between 0 and 1 inclusively, where 1 is the circularity value of an ideal circle);  
491 and 4) cell eccentricity, a measurement of how close the shape of the marked region approaches that  
492 of a line or a circle (eccentricity varies between 0 and 1 inclusively, where 0 is the eccentricity value of  
493 an ideal circle shape and 1 is the eccentricity value of a line segment).

#### 494 **Immunohistochemical PCNA staining and quantification**

495 Serial histological sections of 4  $\mu\text{m}$  thickness were cut, deparaffinized, and rehydrated. For antigen  
496 unmasking, sections were placed in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) and incubated in a heat-  
497 induced antigen retrieval chamber for 20 min at 121°C. After washing, sections were blocked for 30  
498 min with 5% bovine serum albumin in PBS. PCNA primary antibody (NB300-524, Novus Biologicals) was  
499 then incubated overnight at 4°C at a 1:1000 concentration. After washing, tissue sections were  
500 incubated for 1 h at room temperature with an Alexa fluor 647-conjugated anti-rabbit PCNA antibody  
501 (Thermo Fisher Scientific). Nuclear staining with Hoechst was performed before adding a fluorescent  
502 mounting medium. Microscopy was performed using a Leica DM5500 B microscope and data was

503 processed with Leica LAS V3.8 software. Cells positive for PCNA were counted blindly by 2 investigators  
504 (5 crypts/slide, 1 slide/animal).

#### 505 **Quantitative reverse transcription-PCR**

506 Small intestine, cecum, and colon tissue samples were homogenized with ceramic beads using  
507 Precellys lysing equipment (Bertin Technologies). Total RNA was extracted with the NucleoSpin RNA  
508 kit (Macherey-Nagel). Transcript levels of genes were quantified with the StepOne™ Real-Time PCR  
509 System using a SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific). The primer sequences were  
510 designed using Primer Express 3 and are available upon request. Melting curve analyses were  
511 performed for each sample and gene. The relative expression of each target gene was normalized to  
512 the relative expression of the *Polr2a* housekeeping gene. Quantification of target gene expression was  
513 based on the comparative cycle threshold (Ct) value. Fold changes in target genes were analyzed by  
514 the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

#### 515 **Western blot**

516 Proteins were extracted from male ileum samples and homogenized in TRI Reagent® lysis buffer  
517 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Twenty micrograms of total protein  
518 lysate was separated by SDS-PAGE and electroblotted on nitrocellulose membranes using an  
519 Amersham Semi Dry Transfer Unit at 0.8 mA/cm<sup>2</sup> (Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were  
520 blocked for 1 h in StartingBlock™ T20 (TBS) with 5% milk blocking buffer (Thermo Fisher Scientific) at  
521 room temperature. Then membranes were incubated overnight at 4°C with 1:500 of rabbit anti-ZO-1  
522 (Thermo Fisher, 61-7300) and 1 h at room temperature with 1:10,000 of mouse anti-β-actin (Sigma,  
523 A1978). Immunoreactivity was visualized with SuperSignal™ West Pico Plus Chemiluminescent HRP  
524 Substrate (Thermo Fisher Scientific). Images were taken using the iBright FL1500 Imaging System  
525 (Thermo Fisher Scientific). For relative quantification, the volume intensity of the bands was obtained  
526 using iBright software.

#### 527 **Bacterial DNA extraction and Illumina MiSeq sequencing**

528 Genomic DNA was extracted from the colon luminal content using a DNA stool kit (Macherey Nagel,  
529 France). The quantity and purity of DNA (expressed as the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm  
530 (A260/A280)) were assessed using a Nanodrop® spectrophotometer. The sequencing library was  
531 generated by amplifying the V3-V4 region of the bacterial 16S-rRNA gene using 16S rRNA amplicon  
532 generation for MiSeq with the primers Bact-0341 (CCTACGGGNGGCWGCAG) and Bact-0785  
533 (GACTACHVGGGTATCTAATCC). Individual samples were barcoded, pooled to construct the sequencing  
534 library, and sequenced using an Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) to generate paired-end 2x300  
535 bp reads.

#### 536 **Analysis of sequencing data**

537 Bioinformatic analyses were performed using the QIIME2 pipeline (version 2020.2) [67]. The Divisive  
538 Amplicon Denoising Algorithm plug-in (DADA-2) in QIIME2 was used to filter, dereplicate, identify  
539 chimeric sequences, and merge PE reads to obtain a set of ASVs for each sample [68]. Then the  
540 representative sequences were picked for each ASV. The classify-sklearn plug-in in QIIME2, with the  
541 Silva database (version 132), was applied to assign a taxonomic annotation to each representative ASV  
542 sequence. In the next step, ASVs identified as eukaryotic contamination (3 ASVs; 12 reads) and external  
543 contamination, identified with the decontam package (3 ASVs; 3119 reads), were filtered out [69]. The  
544 diversity metrics (alpha and beta diversity) were obtained with the QIIME2 core-metrics-phylogenetic  
545 plug-in, with p-sampling depth parameter fixed to 13781 reads which corresponded to the total  
546 frequency that each sample should be rarefied to prior to computing diversity metrics. This sampling  
547 depth allowed retention of more than 61% of reads and only one sample was discarded. Tests for  
548 differential relative abundance were performed with corncob at the order, family, and genus levels  
549 [70].

#### 550 **Statistics**

551 Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Except for metagenomic data, the  
552 statistical significance of differences between experimental groups was calculated using the Mann-



553 Whitney nonparametric U test (GraphPad Prism software, USA). Statistical significance was defined as  
554  $p < 0.05$ . For all experiments, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.005$ , and \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .

555

556

557 **Declarations**

558 **Ethics approval and consent to participate**

559 Not applicable

560 **Consent for publication**

561 Not applicable

562 **Availability of data and materials**

563 The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding  
564 author on reasonable request.

565 **Competing interests**

566 The authors declare that they have no competing interests.

567 **Funding**

568 Mathilde Body-Malapel is the recipient of a grant from the Association François-Aupetit. Zhuqi Lu is  
569 the recipient of a grant from Fondation pour la Recherche Médicale. This work has received funding  
570 from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme through the  
571 EUROCHAMP-2020 Infrastructure Activity under grant agreement N° 730997. We also  
572 thank CNRS/INSU, INSERM, Région Ile de France, Fondation du Crédit Agricole, Fondation du Souffle,  
573 and UPEC.

574 **Authors' contributions**

575 EG, MD, and CW performed tissue analyses. PC, MC, AB, AG and EAM simulated Beijing-like air  
576 pollution, and ZL performed mice exposures. SG and DH were in charge of microbiota analysis. LD, DL,  
577 and CV contributed to funding acquisition. SL conceptualized and supervised mice exposure. MB-M

578 conceptualized and supervised tissue analyses. MB-M, SL, and PC wrote the original draft. All authors  
579 read and approved the final manuscript.

#### 580 **Acknowledgements**

581 We deeply thank Isabelle Coll for preliminary analysis regarding air quality data, and the Technical  
582 Department from LISA laboratory for continuous support regarding atmospheric simulation (Cécile  
583 Gaimoz, Edouard Pangui and Servanne Chevaillier especially). We thank Juan Camilo Macias Rodriguez  
584 for numerical modelling of the experimental simulation at the laboratory of the Beijing 2017 episode.  
585 We thank Bernadette Leu for her broad-spectrum help. Editorial assistance, in the form of language  
586 editing and correction, was provided by XpertScientific Editing and Consulting Services.

587

588

#### 589 **References**

590

- 591 1. Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJ, Adeyi O, Arnold R, Baldé AB, et al. The Lancet Commission on  
592 pollution and health. *The lancet*. Elsevier; 2018;391:462–512.
- 593 2. Lelieveld J, Pozzer A, Pöschl U, Fnais M, Haines A, Münzel T. Loss of life expectancy from air  
594 pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective. *Cardiovasc Res*. 2020;
- 595 3. Al-Kindi SG, Brook RD, Biswal S, Rajagopalan S. Environmental determinants of cardiovascular  
596 disease: lessons learned from air pollution. *Nat Rev Cardiol*. Nature Publishing Group; 2020;17:656–  
597 72.
- 598 4. Guan W-J, Zheng X-Y, Chung KF, Zhong N-S. Impact of air pollution on the burden of chronic  
599 respiratory diseases in China: time for urgent action. *The Lancet*. 2016;388:1939–51.
- 600 5. Huang S, Zhang X, Huang J, Lu X, Liu F, Gu D. Ambient air pollution and body weight status in  
601 adults: A systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut*. 2020;265:114999.
- 602 6. Costa LG, Cole TB, Dao K, Chang Y-C, Coburn J, Garrick JM. Effects of air pollution on the nervous  
603 system and its possible role in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Pharmacol  
604 Ther*. 2020;210:107523.
- 605 7. Wu M-Y, Lo W-C, Chao C-T, Wu M-S, Chiang C-K. Association between air pollutants and  
606 development of chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Sci Total Environ*.  
607 2020;706:135522.
- 608 8. Orioli R, Solimini AG, Michelozzi P, Forastiere F, Davoli M, Cesaroni G. A cohort study on long-term  
609 exposure to air pollution and incidence of liver cirrhosis. *Environ Epidemiol*. 2020;4:e109.

- 610 9. Noorimotlagh Z, Azizi M, Pan H-F, Mami S, Mirzaee SA. Association between air pollution and  
611 Multiple Sclerosis: A systematic review. *Environ Res.* 2020;110386.
- 612 10. Alsaber A, Pan J, Al-Herz A, Alkandary DS, Al-Hurban A, Setiya P, et al. Influence of Ambient Air  
613 Pollution on Rheumatoid Arthritis Disease Activity Score Index. *Int J Environ Res Public Health.*  
614 *Multidisciplinary Digital Publishing Institute;* 2020;17:416.
- 615 11. Gilcrease GW, Padovan D, Heffler E, Peano C, Massaglia S, Roccatello D, et al. Is air pollution  
616 affecting the disease activity in patients with systemic lupus erythematosus? State of the art and a  
617 systematic literature review. *Eur J Rheumatol.* 2020;7:31–4.
- 618 12. Blaskiewicz PH, Silva AMC, Fernandes V, Junior OBP, Shimoya-Bittencourt W, Ferreira SMB, et al.  
619 Atmospheric Pollution Exposure Increases Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J*  
620 *Environ Res Public Health.* *Multidisciplinary Digital Publishing Institute;* 2020;17:1984.
- 621 13. Vignal C, Guilloteau E, Gower-Rousseau C, Body-Malapel M. Review article: Epidemiological and  
622 animal evidence for the role of air pollution in intestinal diseases. *Sci Total Environ.*  
623 2021;757:143718.
- 624 14. Feng J, Cavallero S, Hsiai T, Li R. Impact of air pollution on intestinal redox lipidome and  
625 microbiome. *Free Radic Biol Med.* 2020;
- 626 15. Kim Juyong Brian, Prunicki Mary, Haddad Francois, Dant Christopher, Sampath Vanitha, Patel  
627 Rushali, et al. Cumulative Lifetime Burden of Cardiovascular Disease From Early Exposure to Air  
628 Pollution. *J Am Heart Assoc.* American Heart Association; 2020;9:e014944.
- 629 16. Rosa MJ, Hair GM, Just AC, Kloog I, Svensson K, Pizano-Zárate ML, et al. Identifying critical  
630 windows of prenatal particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) exposure and early childhood blood pressure.  
631 *Environ Res.* 2020;182:109073.
- 632 17. Deng Q, Lu C, Li Y, Sundell J, Dan Norbäck. Exposure to outdoor air pollution during trimesters of  
633 pregnancy and childhood asthma, allergic rhinitis, and eczema. *Environ Res.* 2016;150:119–27.
- 634 18. Lu C, Norbäck D, Li Y, Deng Q. Early-life exposure to air pollution and childhood allergic diseases:  
635 an update on the link and its implications. *Expert Rev Clin Immunol.* Taylor & Francis; 2020;16:813–  
636 27.
- 637 19. Elten M, Benchimol EI, Fell DB, Kuenzig ME, Smith G, Chen H, et al. Ambient air pollution and the  
638 risk of pediatric-onset inflammatory bowel disease: A population-based cohort study. *Environ Int.*  
639 2020;138:105676.
- 640 20. Liu W, Zhou Y, Yong li, Qin Y, Yu L, Li R, et al. Effects of PM<sub>2.5</sub> exposure during gestation on  
641 maternal gut microbiota and pregnancy outcomes. *Chemosphere.* 2020;247:125879.
- 642 21. Shi Z, Vu T, Kotthaus S, Harrison RM, Grimmond S, Yue S, et al. Introduction to the special issue  
643 “In-depth study of air pollution sources and processes within Beijing and its surrounding region  
644 (APHH-Beijing).” *Atmospheric Chem Phys.* Copernicus GmbH; 2019;19:7519–46.
- 645 22. Johnson AC. Analysis of Air Pollution Trends in Beijing, China. 2020;
- 646 23. Beaumont M, Paës C, Mussard E, Knudsen C, Cauquil L, Aymard P, et al. Gut microbiota derived  
647 metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut*  
648 *Microbes.* Taylor & Francis; 2020;11:1268–86.

- 649 24. Navis M, Martins Garcia T, Renes IB, Vermeulen JL, Meisner S, Wildenberg ME, et al. Mouse fetal  
650 intestinal organoids: new model to study epithelial maturation from suckling to weaning. *EMBO Rep.*  
651 John Wiley & Sons, Ltd; 2019;20:e46221.
- 652 25. Sureda EA, Weström B, Pierzynowski SG, Prykhodko O. Maturation of the Intestinal Epithelial  
653 Barrier in Neonatal Rats Coincides with Decreased FcRn Expression, Replacement of Vacuolated  
654 Enterocytes and Changed Blimp-1 Expression. *PLOS ONE.* Public Library of Science;  
655 2016;11:e0164775.
- 656 26. Garcia TM, Navis M, Wildenberg ME, van Elburg RM, Muncan V. Recapitulating Suckling-to-  
657 Weaning Transition In Vitro using Fetal Intestinal Organoids. *JoVE J Vis Exp.* 2019;e60470.
- 658 27. Muncan V, Heijmans J, Krasinski SD, Büller NV, Wildenberg ME, Meisner S, et al. Blimp1 regulates  
659 the transition of neonatal to adult intestinal epithelium. *Nat Commun.* 2011;2:452.
- 660 28. Harper J, Mould A, Andrews RM, Bikoff EK, Robertson EJ. The transcriptional repressor  
661 Blimp1/Prdm1 regulates postnatal reprogramming of intestinal enterocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*  
662 2011;108:10585–90.
- 663 29. Beumer J, Artegiani B, Post Y, Reimann F, Gribble F, Nguyen TN, et al. Enteroendocrine cells  
664 switch hormone expression along the crypt-to-villus BMP signalling gradient. *Nat Cell Biol.* Nature  
665 Publishing Group; 2018;20:909–16.
- 666 30. Coll P, Cazaunau M, Boczkowski J, Zysman M, Doussin J-F, Gratien A, et al. POLLURISK: AN  
667 INNOVATIVE EXPERIMENTAL PLATFORM TO INVESTIGATE HEALTH IMPACTS OF AIR QUALITY. Naples,  
668 Italy; 2018 [cited 2021 Feb 23]. p. 557–65. Available from:  
669 <http://library.witpress.com/viewpaper.asp?pcode=AIR18-052-1>
- 670 31. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res.*  
671 2011;317:2702–10.
- 672 32. Sumigray KD, Terwilliger M, Lechler T. Morphogenesis and Compartmentalization of the Intestinal  
673 Crypt. *Dev Cell.* 2018;45:183–197.e5.
- 674 33. Naik S, Larsen SB, Gomez NC, Alaverdyan K, Sandoel A, Yuan S, et al. Inflammatory memory  
675 sensitizes skin epithelial stem cells to tissue damage. *Nature.* 2017;550:475–80.
- 676 34. Ge Y, Gong M, Colliou N, Zadeh M, Li J, Jones DP, et al. Neonatal intestinal immune regulation by  
677 the commensal bacterium, *P. UF1*. *Mucosal Immunol.* Nature Publishing Group; 2019;12:434–44.
- 678 35. El Aidy S, Van Baarlen P, Derrien M, Lindenberg-Kortleve DJ, Hooiveld G, Levenez F, et al.  
679 Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune  
680 homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunol.* Nature Publishing Group; 2012;5:567–79.
- 681 36. Köhler A, Delbaue S, Smout J, Torres D, Flamand V. Very early-life exposure to microbiota-  
682 induced TNF drives the maturation of neonatal pre-cDC1. *Gut.* BMJ Publishing Group; 2021;70:511–  
683 21.
- 684 37. Razzaghian HR, Sharafian Z, Sharma AA, Boyce GK, Lee K, Da Silva R, et al. Neonatal T Helper 17  
685 Responses Are Skewed Towards an Immunoregulatory Interleukin-22 Phenotype. *Front Immunol*  
686 [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 17];12. Available from:  
687 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8126652/>



- 688 38. Mirpuri J. The emerging role of group 3 innate lymphoid cells in the neonate: interaction with the  
689 maternal and neonatal microbiome. *Oxf Open Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 17];2.  
690 Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfimm/iqab009>
- 691 39. Chen Y-S, Chen I-B, Pham G, Shao T-Y, Bangar H, Way SS, et al. IL-17–producing  $\gamma\delta$  T cells protect  
692 against *Clostridium difficile* infection. *J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation*;  
693 2020;130:2377–90.
- 694 40. Weström B, Arévalo Sureda E, Pierzynowska K, Pierzynowski SG, Pérez-Cano F-J. The Immature  
695 Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Front Immunol*  
696 [Internet]. *Frontiers*; 2020 [cited 2021 Jun 17];11. Available from:  
697 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01153/full>
- 698 41. Akdis CA. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and  
699 other chronic conditions? *Nat Rev Immunol*. 2021;1–13.
- 700 42. Sarkar A, Yoo JY, Valeria Ozorio Dutra S, Morgan KH, Groer M. The Association between Early-Life  
701 Gut Microbiota and Long-Term Health and Diseases. *J Clin Med. Multidisciplinary Digital Publishing*  
702 *Institute*; 2021;10:459.
- 703 43. Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio  
704 in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. *Microorganisms. Multidisciplinary*  
705 *Digital Publishing Institute*; 2020;8:1715.
- 706 44. Low A, Soh M, Miyake S, Seedorf H. Host-age prediction from fecal microbiome composition in  
707 laboratory mice. *bioRxiv. Cold Spring Harbor Laboratory*; 2020;2020.12.04.412734.
- 708 45. Dou X, Gao N, Yan D, Shan A. Sodium Butyrate Alleviates Mouse Colitis by Regulating Gut  
709 Microbiota Dysbiosis. *Animals. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2020;10:1154.
- 710 46. Chen Q, Wang Y, Jiao F, Shi C, Pei M, Wang L, et al. Betaine inhibits Toll-like receptor 4 responses  
711 and restores intestinal microbiota in acute liver failure mice. *Sci Rep*. 2020;10:21850.
- 712 47. Chiodini RJ, Dowd SE, Chamberlin WM, Galandiuk S, Davis B, Glassing A. Microbial Population  
713 Differentials between Mucosal and Submucosal Intestinal Tissues in Advanced Crohn’s Disease of the  
714 Ileum. *PLOS ONE. Public Library of Science*; 2015;10:e0134382.
- 715 48. Oezguen N, Yalcinkaya N, Küçükali CI, Dahdouli M, Hollister EB, Luna RA, et al. Microbiota  
716 stratification identifies disease-specific alterations in neuro-Behcet’s disease and multiple sclerosis.  
717 *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37:S58-66.
- 718 49. Munyaka PM, Rabbi MF, Khafipour E, Ghia J-E. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis  
719 promotes gut microbial dysbiosis in mice. *J Basic Microbiol*. 2016;56:986–98.
- 720 50. Kuhn KA, Schulz HM, Regner EH, Severs EL, Hendrickson JD, Mehta G, et al. Bacteroidales recruit  
721 IL-6-producing intraepithelial lymphocytes in the colon to promote barrier integrity. *Mucosal*  
722 *Immunol*. 2018;11:357–68.
- 723 51. Coyne MJ, Béchon N, Matano LM, McEneaney VL, Chatzidaki-Livanis M, Comstock LE. A family of  
724 anti-Bacteroidales peptide toxins wide-spread in the human gut microbiota. *Nat Commun*.  
725 2019;10:3460.

- 726 52. Zitomersky NL, Atkinson BJ, Franklin SW, Mitchell PD, Snapper SB, Comstock LE, et al.  
727 Characterization of Adherent Bacteroidales from Intestinal Biopsies of Children and Young Adults  
728 with Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE*. Public Library of Science; 2013;8:e63686.
- 729 53. Bolton JL, Smith SH, Huff NC, Gilmour MI, Foster WM, Auten RL, et al. Prenatal air pollution  
730 exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-  
731 specific manner. *FASEB J*. 2012;26:4743–54.
- 732 54. Thaver S, Foa L, Richards SM, Lyons AB, Zosky GR. In utero exposure to diesel exhaust particles,  
733 but not silica, alters post-natal immune development and function. *Chemosphere*. 2021;268:129314.
- 734 55. Clougherty Jane E. A Growing Role for Gender Analysis in Air Pollution Epidemiology. *Environ*  
735 *Health Perspect*. *Environmental Health Perspectives*; 2010;118:167–76.
- 736 56. Shukla A, Bunkar N, Kumar R, Bhargava A, Tiwari R, Chaudhury K, et al. Air pollution associated  
737 epigenetic modifications: Transgenerational inheritance and underlying molecular mechanisms. *Sci*  
738 *Total Environ*. 2019;656:760–77.
- 739 57. Tsamou M, Vrijens K, Madhloum N, Lefebvre W, Vanpoucke C, Nawrot TS. Air pollution-induced  
740 placental epigenetic alterations in early life: a candidate miRNA approach. *Epigenetics*. 2018;13:135–  
741 46.
- 742 58. Vrijens K, Trippas A-J, Lefebvre W, Vanpoucke C, Penders J, Janssen BG, et al. Association of  
743 Prenatal Exposure to Ambient Air Pollution With Circulating Histone Levels in Maternal Cord Blood.  
744 *JAMA Netw Open*. 2020;3:e205156–e205156.
- 745 59. Meakin AS, Cuffe JS, Darby JR, Morrison JL, Clifton VL. Let’s Talk about Placental Sex, Baby:  
746 Understanding Mechanisms That Drive Female-and Male-Specific Fetal Growth and Developmental  
747 Outcomes. *Int J Mol Sci*. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2021;22:6386.
- 748 60. Di Ciaula A, Baj J, Garruti G, Celano G, De Angelis M, Wang HH, et al. Liver steatosis, gut-liver axis,  
749 microbiome and environmental factors. A never-ending bidirectional cross-talk. *J Clin Med*.  
750 *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2020;9:2648.
- 751 61. Bolton JL, Marinero S, Hassanzadeh T, Natesan D, Le D, Belliveau C, et al. Gestational Exposure to  
752 Air Pollution Alters Cortical Volume, Microglial Morphology, and Microglia-Neuron Interactions in a  
753 Sex-Specific Manner. *Front Synaptic Neurosci* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jan 28];9. Available from:  
754 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsyn.2017.00010>
- 755 62. Mayer EA, Nance K, Chen S. The Gut–Brain Axis. *Annu Rev Med*. *Annual Reviews*; 2021;73.
- 756 63. Kim D, Chen Z, Zhou L-F, Huang S-X. Air pollutants and early origins of respiratory diseases.  
757 *Chronic Dis Transl Med*. 2018;4:75–94.
- 758 64. Ma Y, Yang X, Chatterjee V, Wu MH, Yuan SY. The Gut–Lung Axis in Systemic Inflammation. Role  
759 of Mesenteric Lymph as a Conduit. *Am J Respir Cell Mol Biol*. *American Thoracic Society*; 2021;64:19–  
760 28.
- 761 65. Chen D, Liao H, Yang Y, Chen L, Zhao D, Ding D. Simulated impacts of vertical distributions of black  
762 carbon aerosol on meteorology and PM 2.5 concentrations in Beijing during severe haze events.  
763 *Atmospheric Chem Phys*. *Copernicus GmbH*; 2022;22:1825–44.

764 66. Lustig M, Feng Q, Payan Y, Gefen A, Benayahu D. Noninvasive continuous monitoring of adipocyte  
765 differentiation: From macro to micro scales. *Microsc Microanal.* Cambridge University Press;  
766 2019;25:119–28.

767 67. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible,  
768 interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.*  
769 2019;37:852–7.

770 68. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution  
771 sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13:581–3.

772 69. Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and  
773 removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome.*  
774 2018;6:226.

775 70. Martin BD, Witten D, Willis AD. MODELING MICROBIAL ABUNDANCES AND DYSBIOSIS WITH  
776 BETA-BINOMIAL REGRESSION. *Ann Appl Stat.* 2020;14:94–115.

777 **Figure titles and legends**

778 **Fig.1** Histomorphological analysis in male mice. **A** Representative pictures of MGG-stained proximal  
779 colon from control air- and Beijing-like air-exposed mice, scale bar 500  $\mu\text{m}$  (n=10/group). **B** Submucosa  
780 cellularity. **C** Mucosal surface area. **D** Representative pictures of MGG-stained ileum from control air-  
781 and Beijing-like air-exposed mice, scale bar 200  $\mu\text{m}$  (n=10/group). **E** Villus length. **F** Crypt depth. **G**  
782 Villus/crypt ratio. **H** Vacuole number per villus. **I** Mean vacuolated area per villus. **J** Vacuole circularity  
783 index. **K** Mean eccentricity index. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.005$ , \*\*\*\*  $p<0.001$  as determined by  
784 the Mann-Whitney U test.

785 **Fig.2** Histomorphological analysis in female mice. **A** Representative pictures of MGG-stained proximal  
786 colon from control air- and Beijing-like air-exposed mice, scale bar 500  $\mu\text{m}$  (n=10/group). **B** Submucosa  
787 cellularity. **C** Mucosal surface area. **D** Representative pictures of MGG-stained ileum control air- and  
788 Beijing-like air-exposed mice, scale bar 200  $\mu\text{m}$  (n=10/group). **E** Villus length. **F** Crypt depth. **G**  
789 Villus/crypt ratio. **H** Vacuole number per villus. **I** Mean vacuolated area per villus. **J** Vacuole circularity  
790 index. **K** Mean eccentricity index.

791 **Fig.3** Epithelium proliferation, differentiation, and maturation in male mice. **A** Representative pictures  
792 of PCNA-stained proximal colon from control air- and Beijing-like air-exposed mice, scale bar 50  $\mu\text{m}$   
793 (n=10/group). **B** Number of PCNA positive cells/crypt. **C** *Lgr5* transcript levels. **D** *Alpi*, *Epcam*, and *Car2*



794 transcript levels. **E** *Muc2*, *Lyz1*, *ChrgA*, and *Pou2f3* transcript levels. **F** *Ass1*, *Fcgrt*, *Prdm1*, and *Lct*  
795 transcript levels. **G** *Treh*, *Arg2*, and *Sis* transcript levels. **H** Representative pictures of PCNA-stained  
796 ileum from control air- and Beijing-like air-exposed mice, scale bar 50  $\mu$ m (n=10/group). **I** Number of  
797 PCNA-positive cells/crypt. **J** *Lgr5* transcript levels. **K** *Alpi*, *Epcam*, and *Car2* transcript levels. **L** *Muc2*,  
798 *Lyz1*, *ChrgA*, and *Pou2f3* transcript levels. **M** *Ass1*, *Fcgrt*, *Prdm1*, and *Lct* transcript levels. **N** *Treh*, *Arg2*,  
799 and *Sis* transcript levels. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.005 as determined by the Mann-Whitney U test.

800 **Fig.4** Epithelium proliferation, differentiation, and maturation in female mice. **A** Representative  
801 pictures of PCNA-stained proximal colon from control air- and Beijing-like air-exposed mice, scale bar  
802 50  $\mu$ m (n=10/group). **B** Number of PCNA-positive cells/crypt. **C** *Lgr5* transcript levels. **D** *Alpi*, *Epcam*,  
803 and *Car2* transcript levels. **E** *Muc2*, *Lyz1*, *ChrgA*, and *Pou2f3* transcript levels. **F** *Ass1*, *Fcgrt*, *Prdm1*, and  
804 *Lct* transcript levels. **G** *Treh*, *Arg2*, and *Sis* transcript levels. **H** Representative pictures of PCNA-stained  
805 ileum from control air- and Beijing-like air-exposed mice, scale bar 50  $\mu$ m (n=10/group). **I** Number of  
806 PCNA-positive cells/crypt. **J** *Lgr5* transcript levels. **K** *Alpi*, *Epcam*, and *Car2* transcript levels. **L** *Muc2*,  
807 *Lyz1*, *ChrgA*, and *Pou2f3* transcript levels. **M** *Ass1*, *Fcgrt*, *Prdm1*, and *Lct* transcript levels. **N** *Treh*, *Arg2*,  
808 and *Sis* transcript levels. \* p<0.05, \*\* p<0.01 as determined by the Mann-Whitney U test.

809 **Fig.5** Inflammatory pattern in male mice. Transcript levels of Th1 (*Tbx21*, *Tnf $\alpha$* , *Ifn $\gamma$* ), Th2 (*Gata3*, *Il4*,  
810 *Il5*, *Il13*), Th17 (*Rorc*, *Il17a*, *Il22*), and Treg (*Foxp3*, *Il10*, *Tgfb $\beta$* ) genes in proximal colon (**A**), cecum (**B**),  
811 and ileum (**C**) from control air- and Beijing-like air-exposed male mice (n=10/group). \* p<0.05, \*\*  
812 p<0.01, \*\*\* p<0.005 as determined by the Mann-Whitney U test.

813 **Fig.6** Inflammatory pattern in female mice. Transcript levels of Th1 (*Tbx21*, *Tnf $\alpha$* , *Ifn $\gamma$* ), Th2 (*Gata3*, *Il4*,  
814 *Il5*, *Il13*), Th17 (*Rorc*, *Il17a*, *Il22*), and Treg (*Foxp3*, *Il10*, *Tgfb $\beta$* ) genes in proximal colon (**A**), cecum (**B**),  
815 and ileum (**C**) from control air- and Beijing-like air-exposed male mice (n=10/group). \*\* p<0.01 as  
816 determined by the Mann-Whitney U test.

817 **Fig.7** Tight junction expression in male and female mice. **A-B** Transcript levels of *Ocln*, *Tjp1* and *Cldn4*  
818 in proximal colon, cecum, and ileum of male (**A**) and female (**B**) mice exposed to control air or Beijing-

819 like air (n=10/group). **C** ZO-1 and  $\beta$ -actin western blot analysis of male ileum. **D** Densitometric analysis  
820 of ZO-1 western blots. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  as determined by the Mann-Whitney U test.

821 **Fig.8** Luminal content microbiota analysis in male and female mice exposed *in utero* to control air or  
822 Beijing-like air (n=10/group). **A** Chao1  $\alpha$ -diversity index. **B** Weighted UniFrac  $\beta$ -diversity index. **C**  
823 Overview of the relative abundance of gut bacteria depicted at the phylum level. **D** Overview of the  
824 relative abundance of gut bacteria depicted at the order level. **E** The differential abundance of  
825 significantly changed bacterial orders in female mice. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.005$  as determined by Corncob.  
826 **F** *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio. \*\*  $p < 0.01$  as determined by the Mann-Whitney U test.

827

#### 828 **Supplementary information**

829 **Fig S1** Overview of mice exposure in a dedicated exposure device. A realistic atmosphere,  
830 representative of a 2017 pollution event in Beijing, was generated in the CESAM atmospheric  
831 simulation chamber, at the extreme left of the figure. Mice were exposed to simulated Beijing-like air  
832 pollution (both gaseous and particulate phases) directly transferred from CESAM into the top part of  
833 the exposure device, while control mice (at the bottom part of the exposure device) were exposed to  
834 filtered Beijing-like air pollution during the same period.

835 **Fig S2** Dam and pup general outcomes. **A** Litter size. **B** Offspring gender proportion. **C** Dam body  
836 weight. **D** Offspring body weight.

837 **Fig S3** Enteroendocrine cell populations markers in female ileum. Transcript levels of *Tac1*, *Gcg*, *Pyy*,  
838 *Gip*, *Nts*, and *Sct* in mice exposed to control air or Beijing-like air (n=10/group).

839 **Fig S4** Evenness and Simpson  $\alpha$ -diversity index of luminal content microbiota in male and female mice  
840 exposed *in utero* to control air or Beijing-like air (n=10/group).

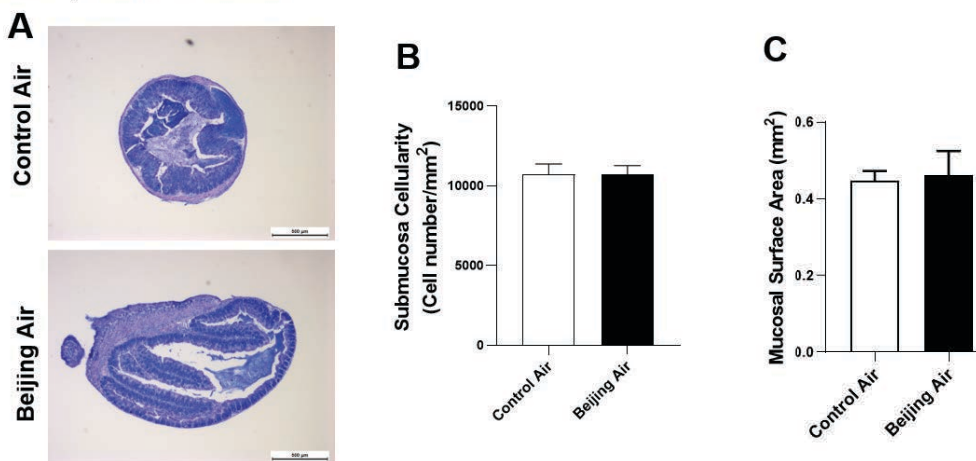
841 **Fig S5** Table summarizing the endpoints studied and the significant differences observed.

842 **Fig S6** Numerical modelling of the chemical activity inside CESAM chamber.

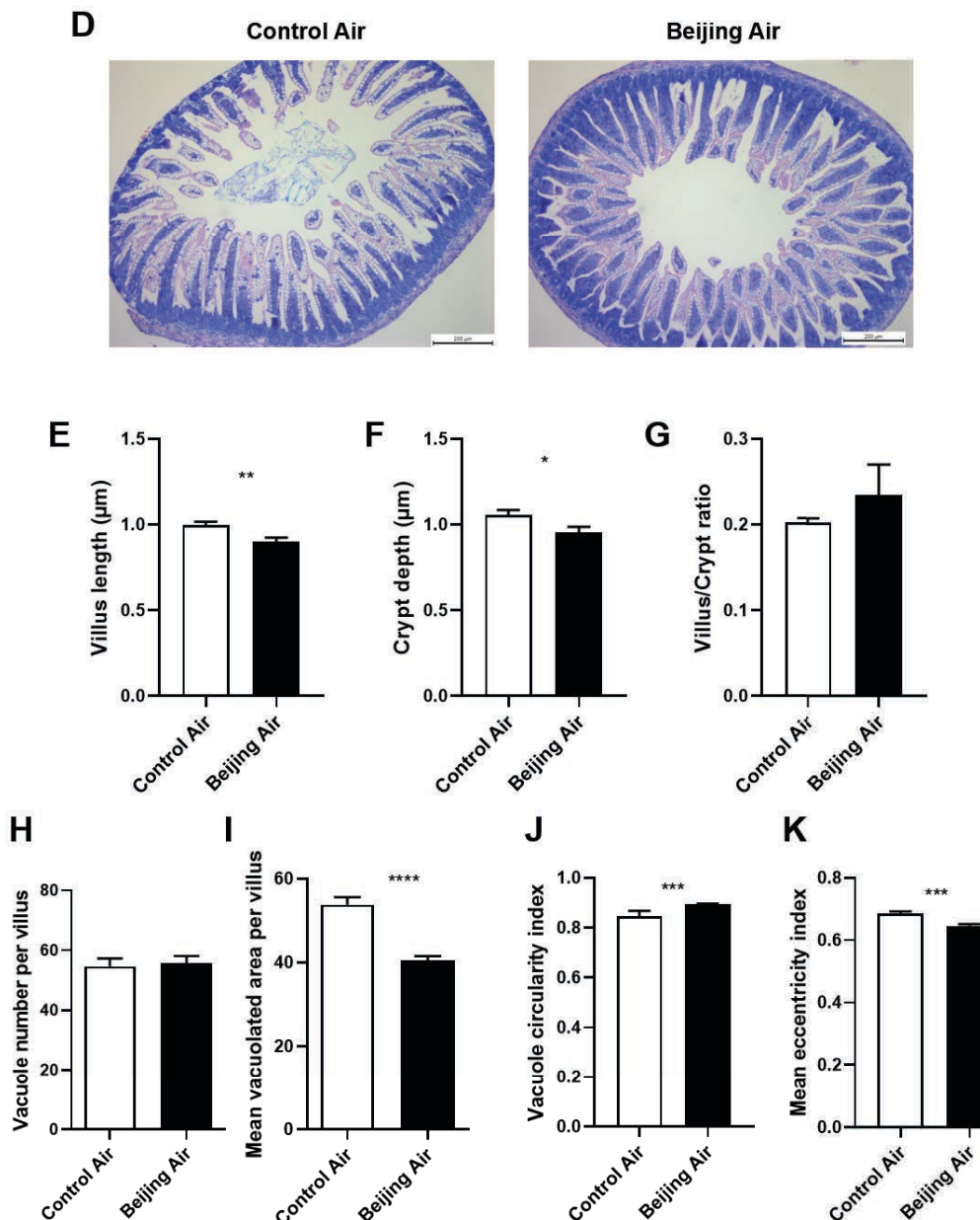
843 **Fig S7** Concentration of PM ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) during the experimental campaign. Each day a maximum peak is  
844 resulting from injection of soot and dust particles.

845

**Male proximal colon**

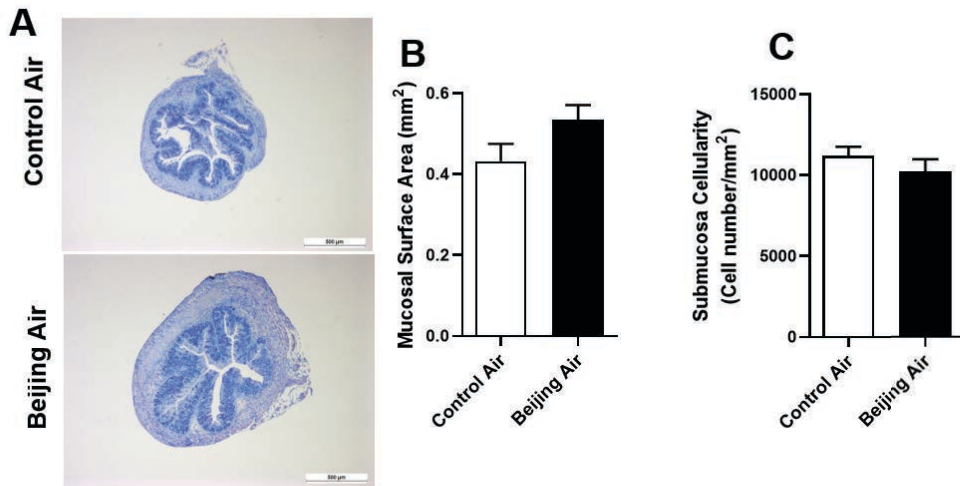


**Male ileum**

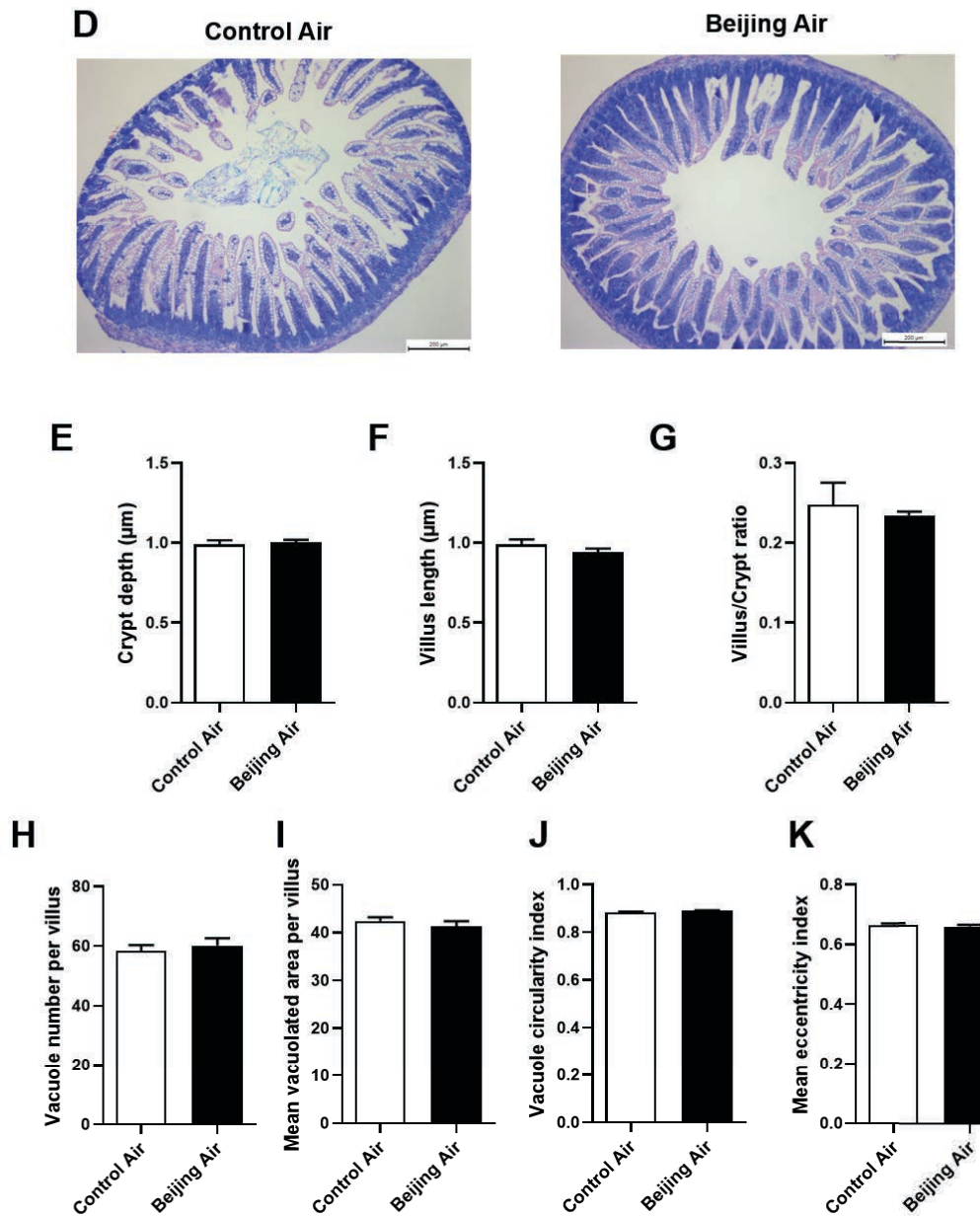


**Figure 1** Histomorphological analysis in male mice.

**Female proximal colon**



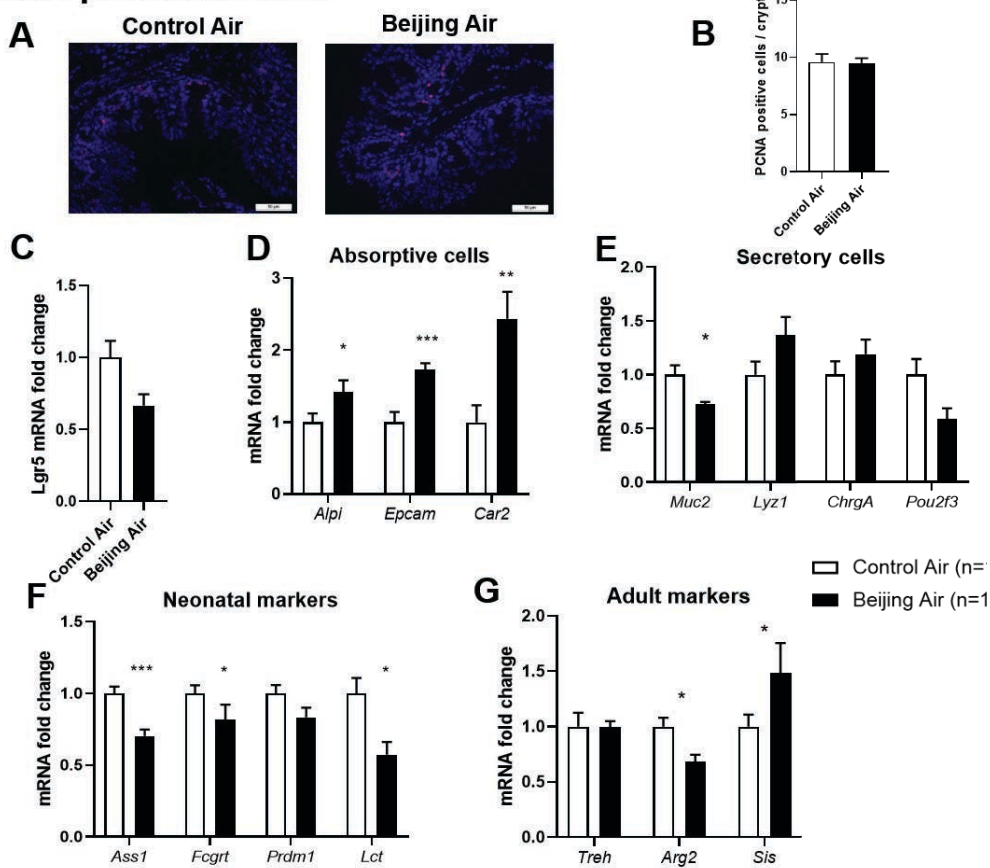
**Female ileum**



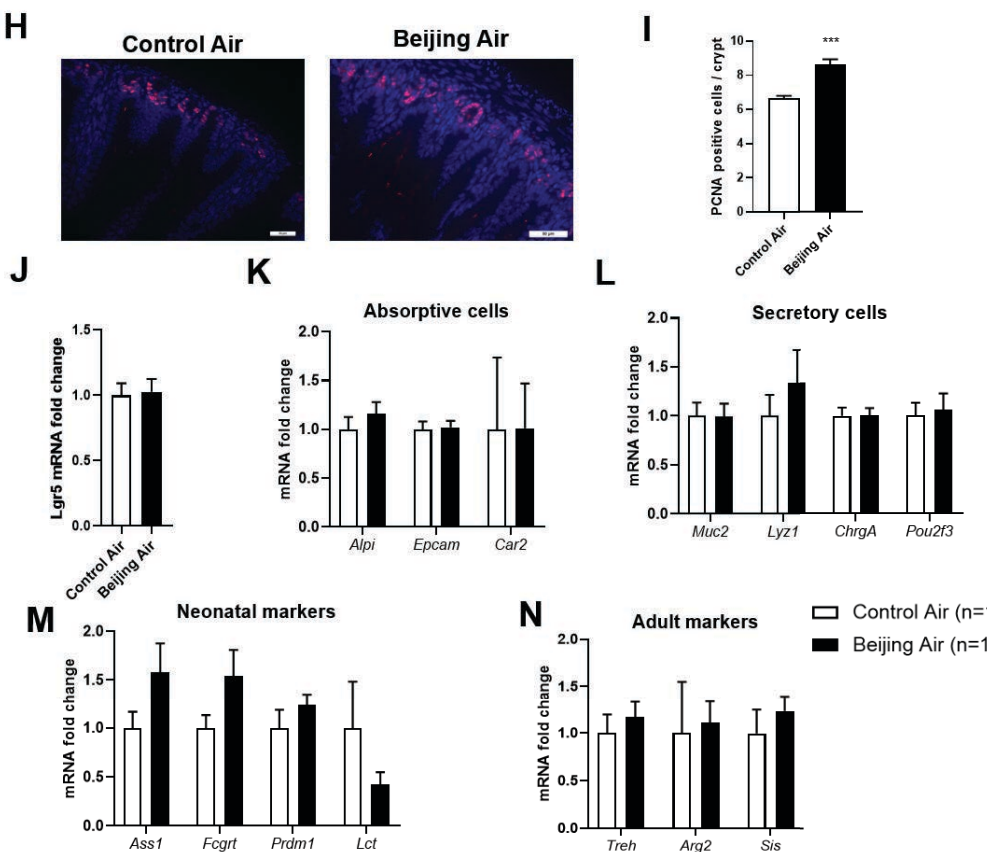
**Figure 2** Histomorphological analysis in female mice.



**Male proximal colon**



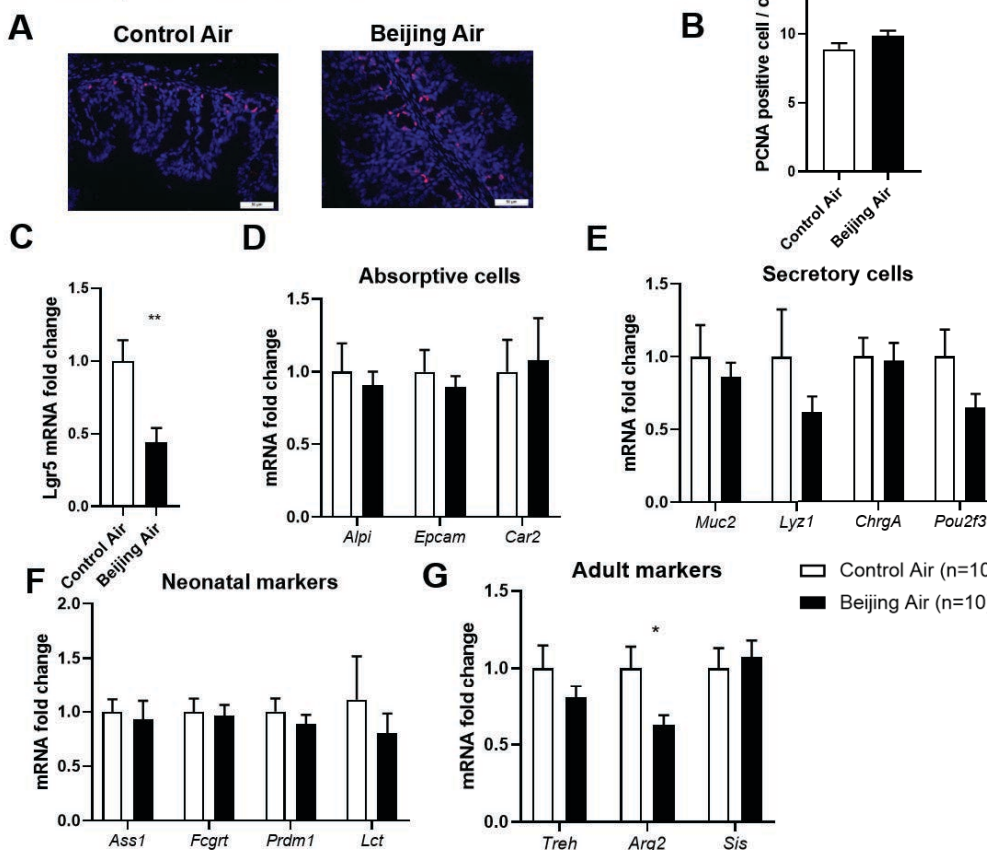
**Male ileum**



**Figure 3** Epithelium proliferation, differentiation and maturation in male mice.



### Female proximal colon



### Female ileum

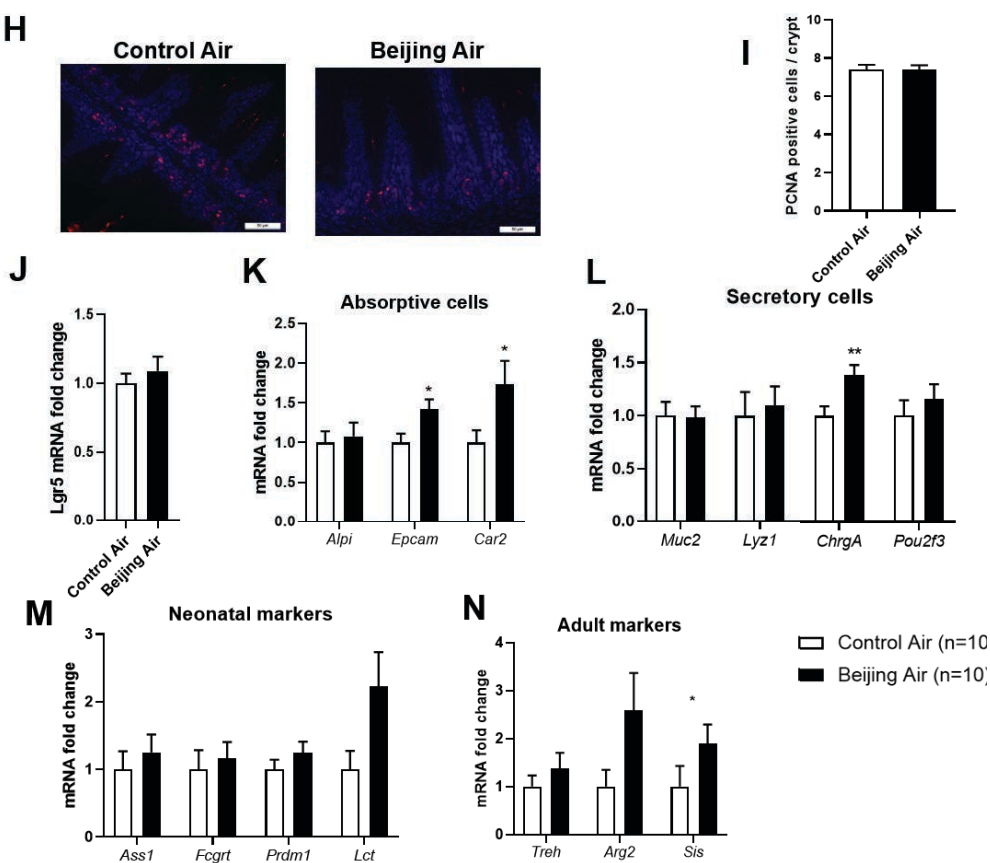
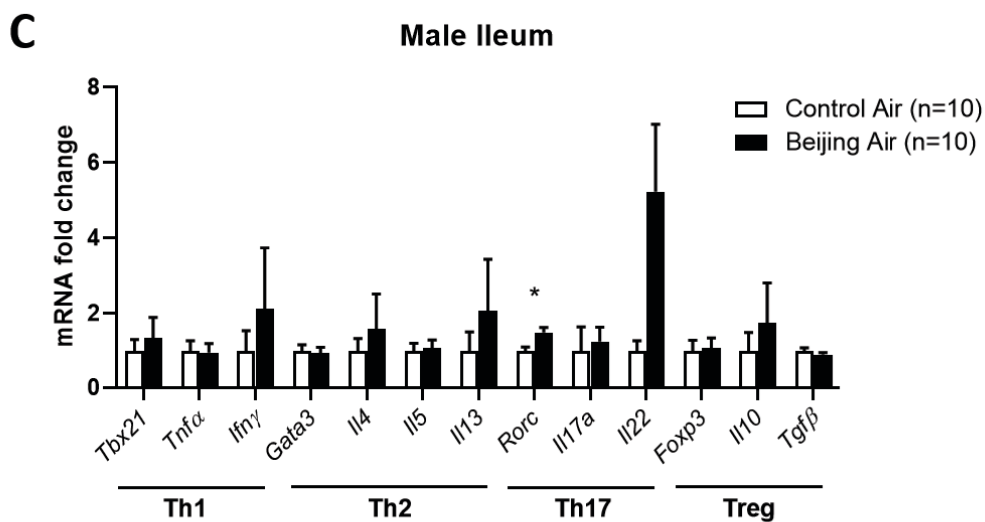
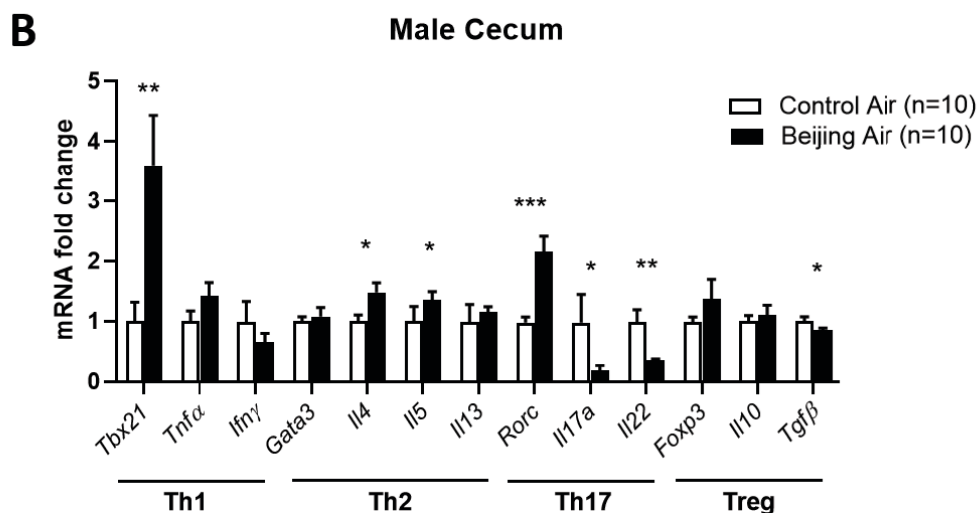
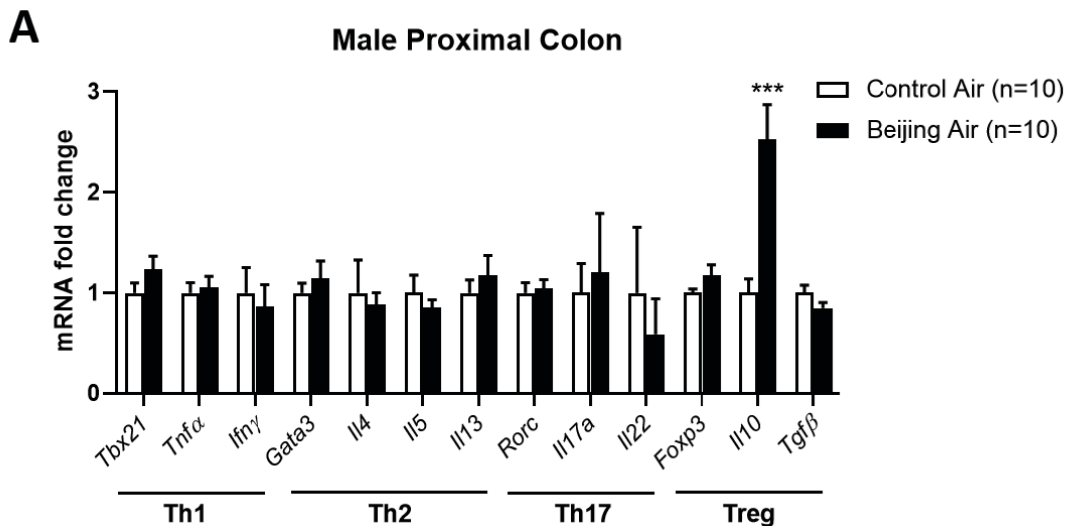
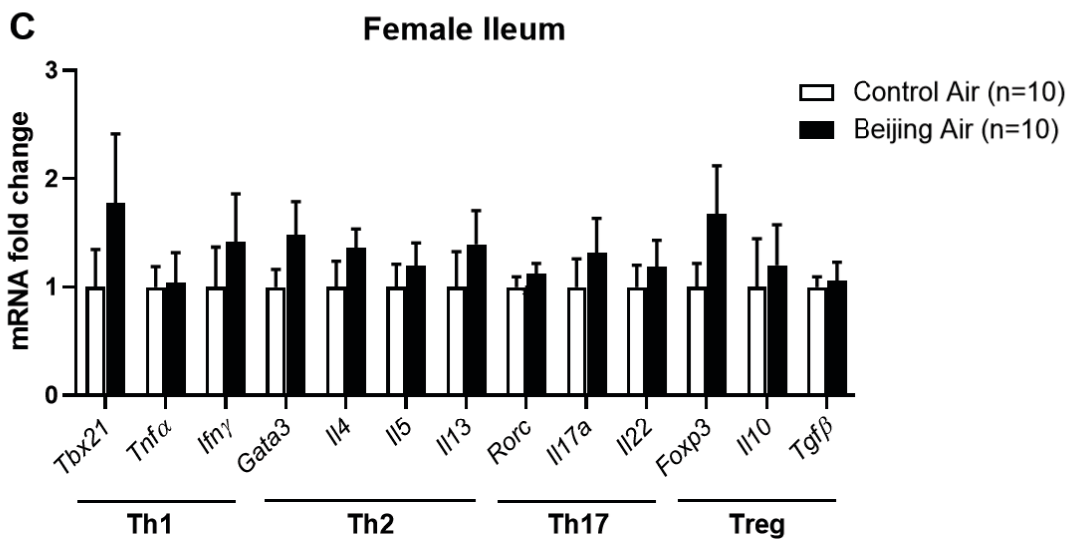
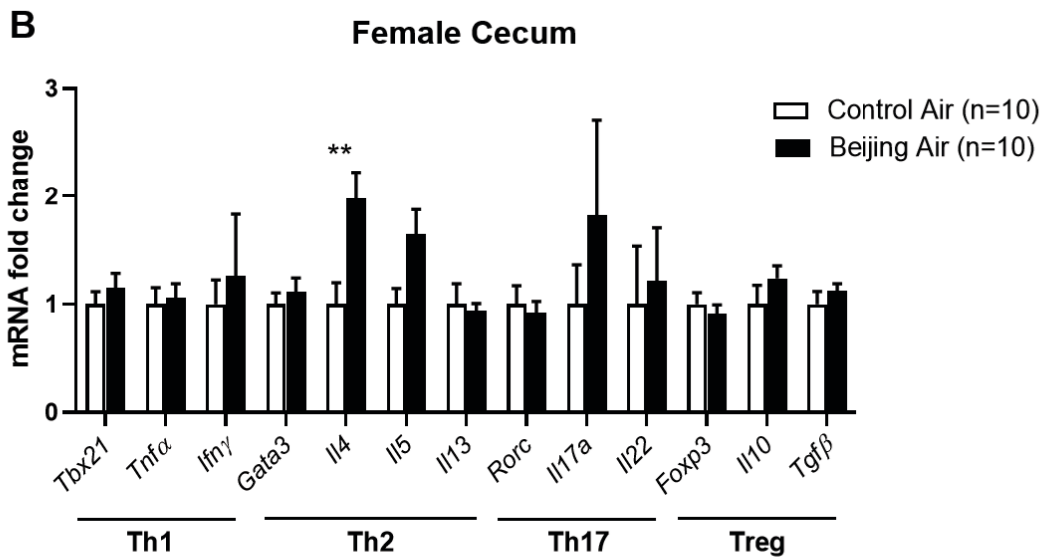
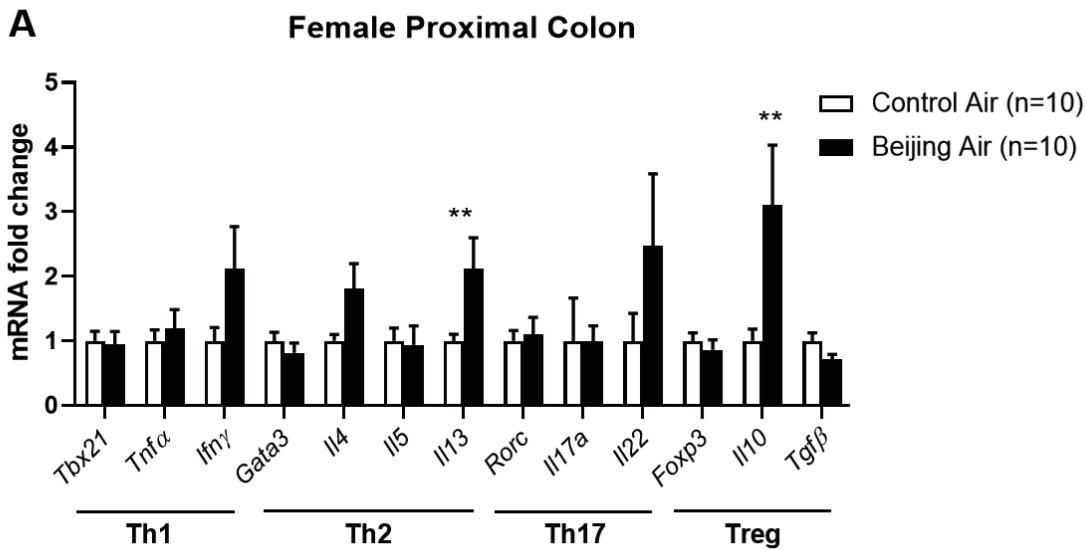
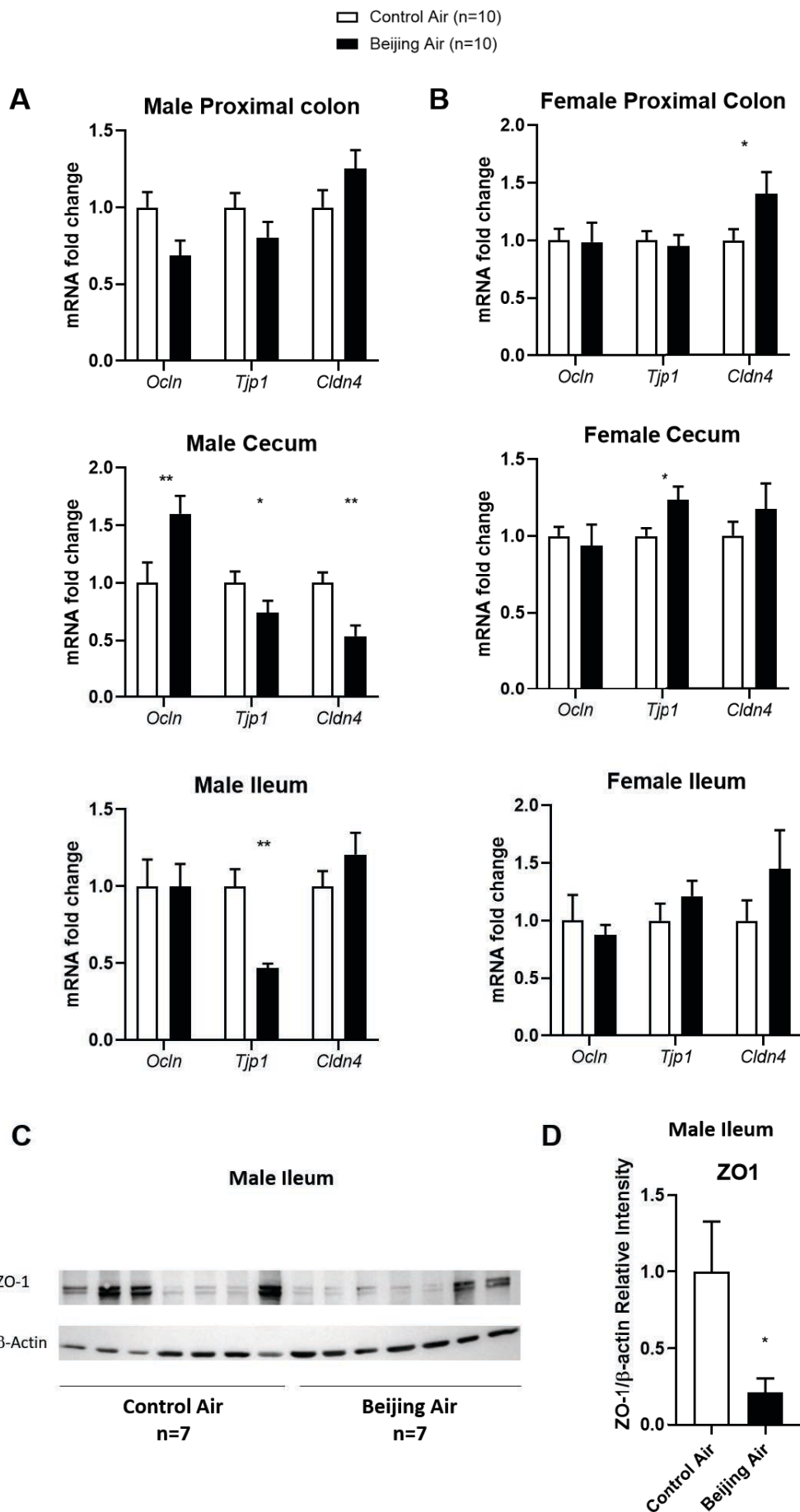


Figure 4 Epithelium proliferation, differentiation and maturation in female mice.







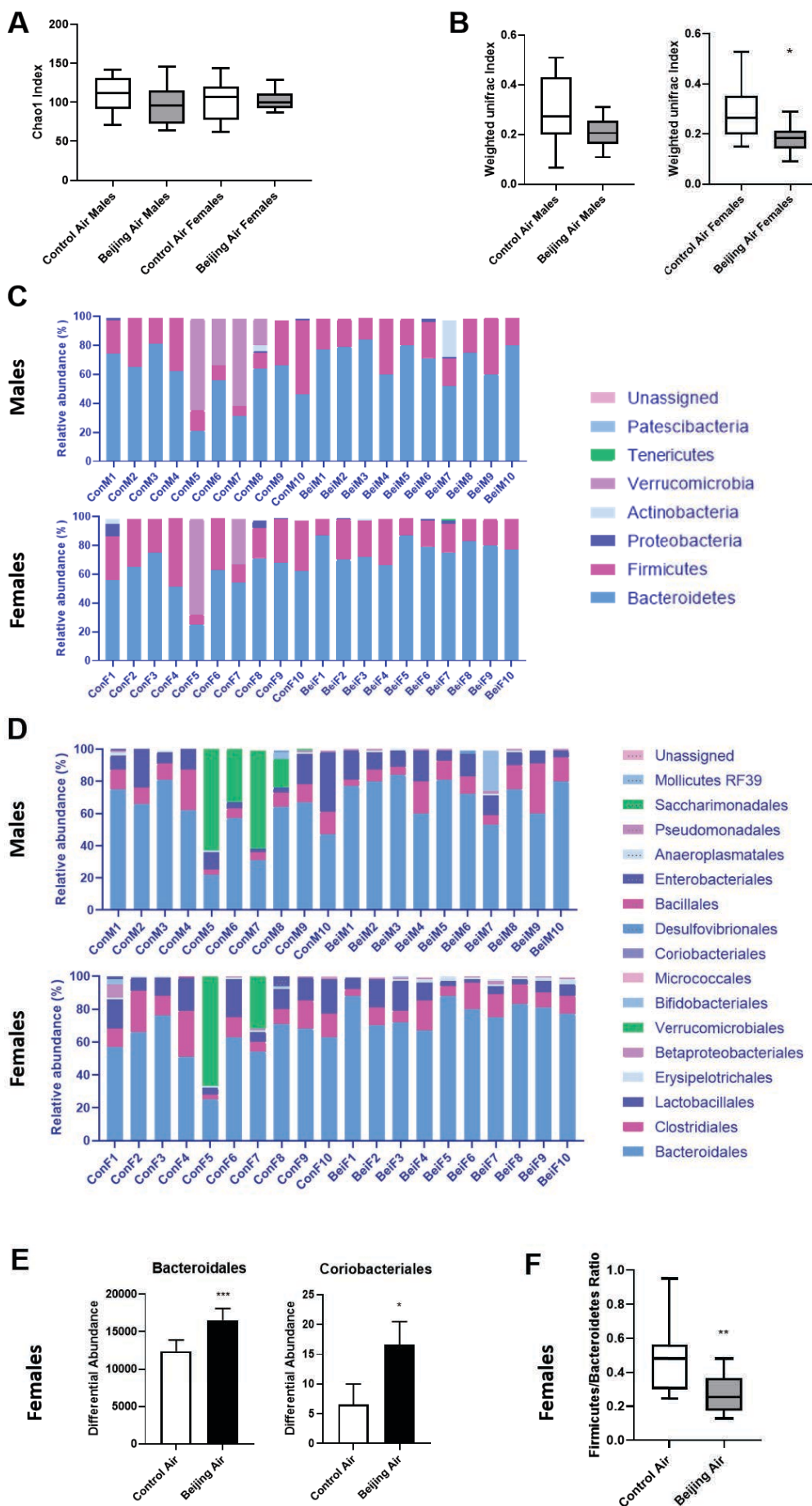
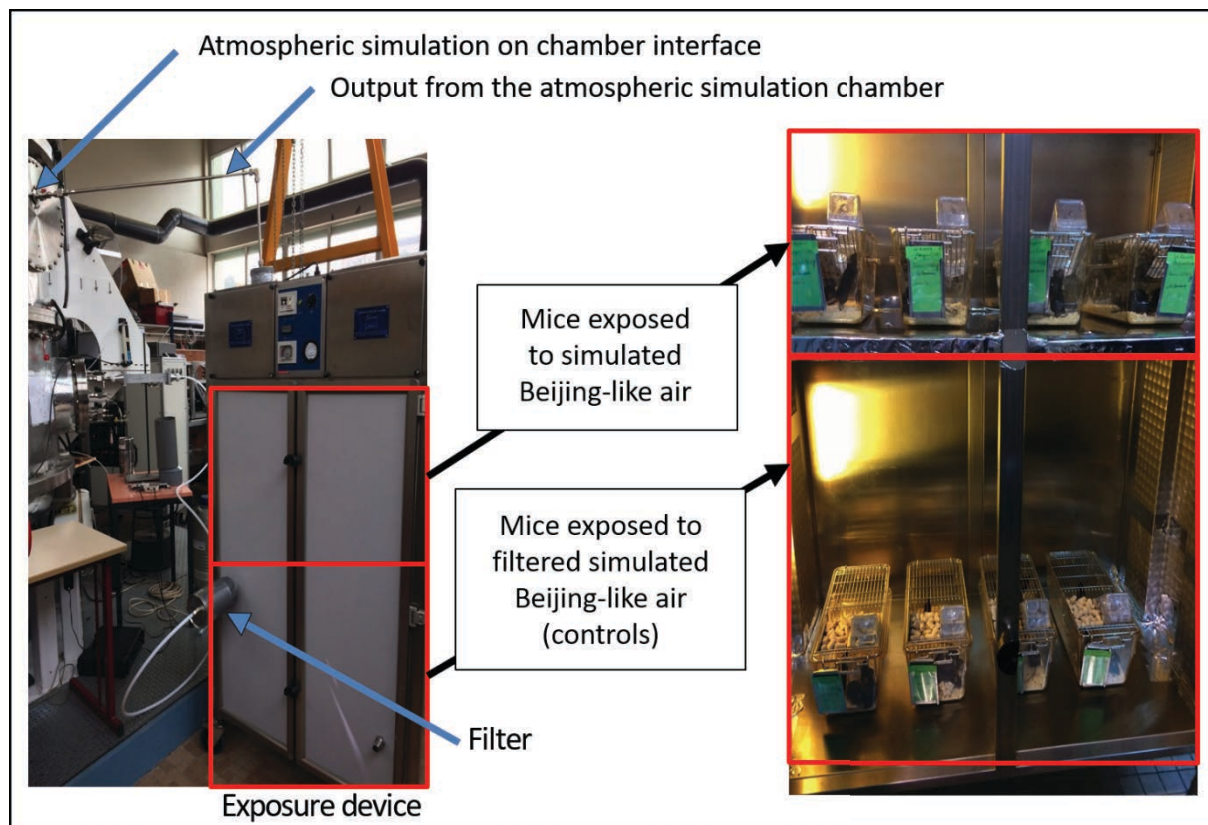


Figure 8 Luminal content microbiota analysis in male and female mice in utero exposed to control air or Beijiing air (n=10/group)

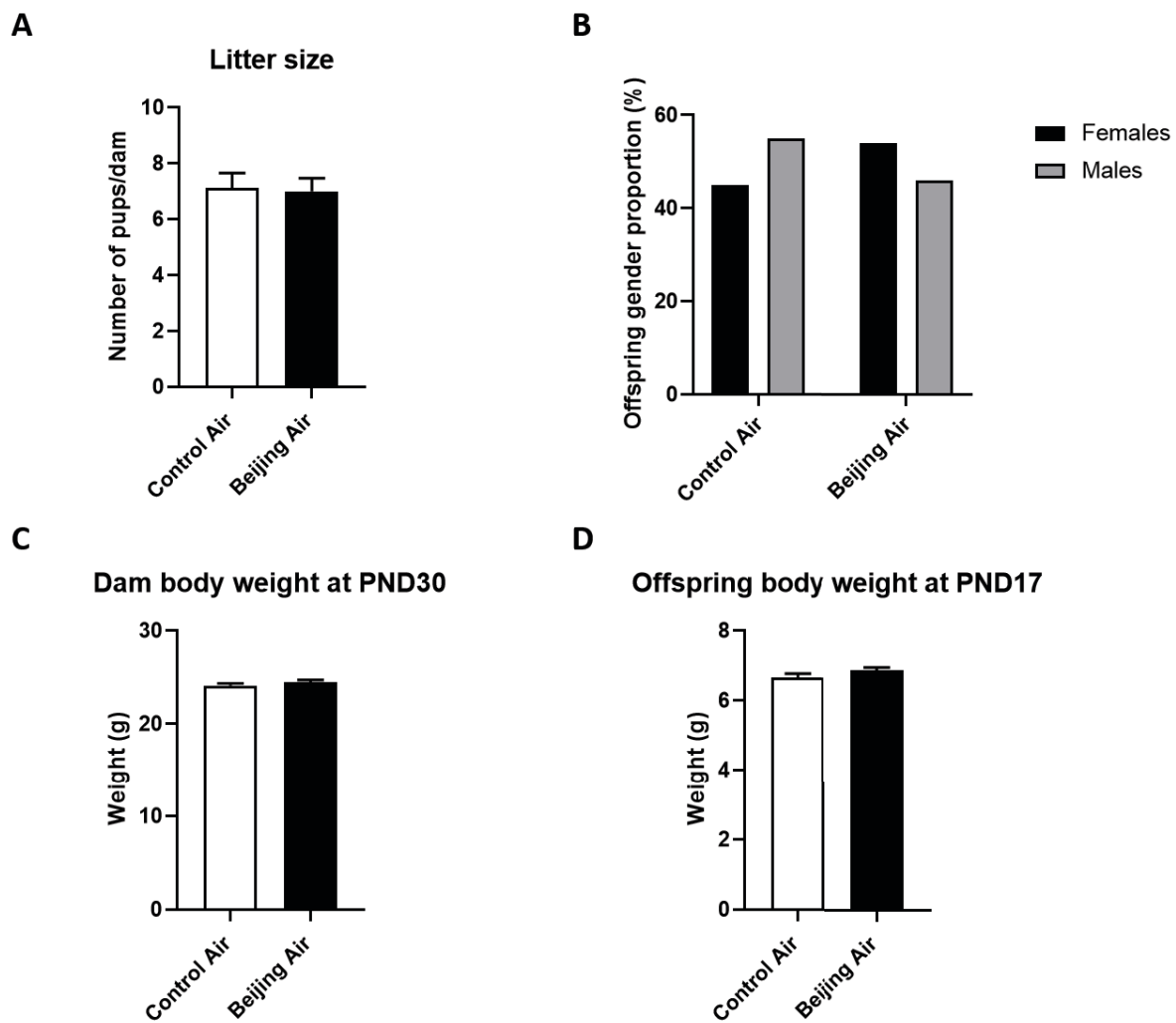
**Additional file 1****Murine *in utero* exposure to simulated complex urban air pollution disturbs intestinal suckling-to-weaning transition in mice in a sex-dependent manner.**

Eva Guilloteau<sup>1</sup>, Patrice Coll<sup>2</sup>, Zhuyi Lu<sup>3</sup>, Madjid Djouina<sup>1</sup>, Mathieu Cazaunau<sup>4</sup>, Christophe Waxin<sup>1</sup>, Antonin Bergé<sup>2</sup>, Ségolène Caboche<sup>5</sup>, Aline Gratien<sup>2</sup>, Elie Al Marj<sup>2</sup>, David Hot<sup>5</sup>, Laurent Dubuquoy<sup>1</sup>, David Launay<sup>1</sup>, Cécile Vignal<sup>1</sup>, Sophie Lanone<sup>3</sup>, Mathilde Body-Malapel<sup>1</sup>

1. *Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France*
2. **Université de Paris and Univ Paris Est Creteil, CNRS, LISA, F-75013 Paris, France**
3. *Univ. Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, F-94010 Créteil, France*
4. *Univ. Paris Est Créteil and Université de Paris, CNRS, LISA, F-94010 Créteil, France*
5. *Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR2014-US41-PLBS-Plateformes Lilloises de Biologie & Santé, F-59000, Lille, France*



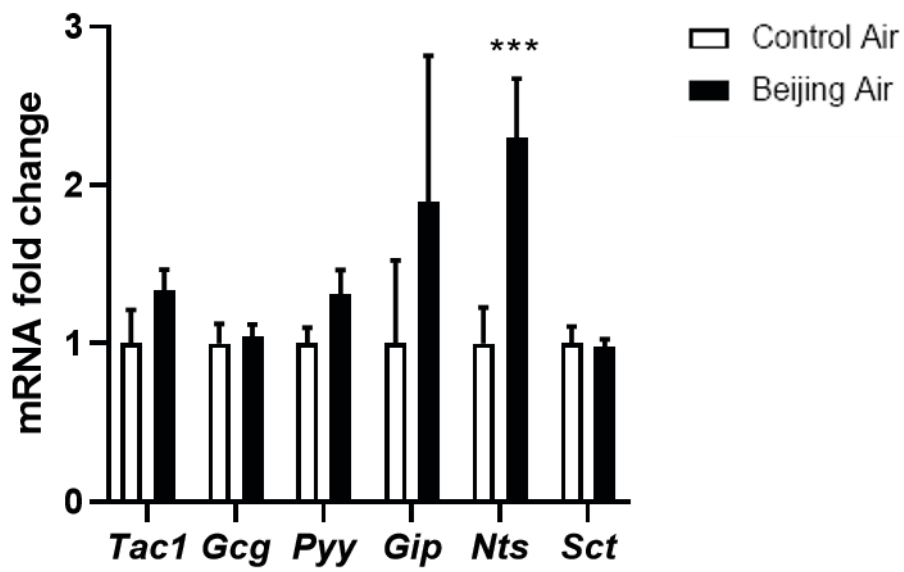
**Fig S1** Overview of mice exposure in a dedicated exposure device. A realistic atmosphere, representative of a 2017 pollution event in Beijing, was generated in the CESAM atmospheric simulation chamber, at the extreme left of the figure. Mice were exposed to simulated Beijing-like air pollution (both gaseous and particulate phases) directly transferred from CESAM into the top part of the exposure device, while control mice (at the bottom part of the exposure device) were exposed to filtered Beijing-like air pollution during the same period.



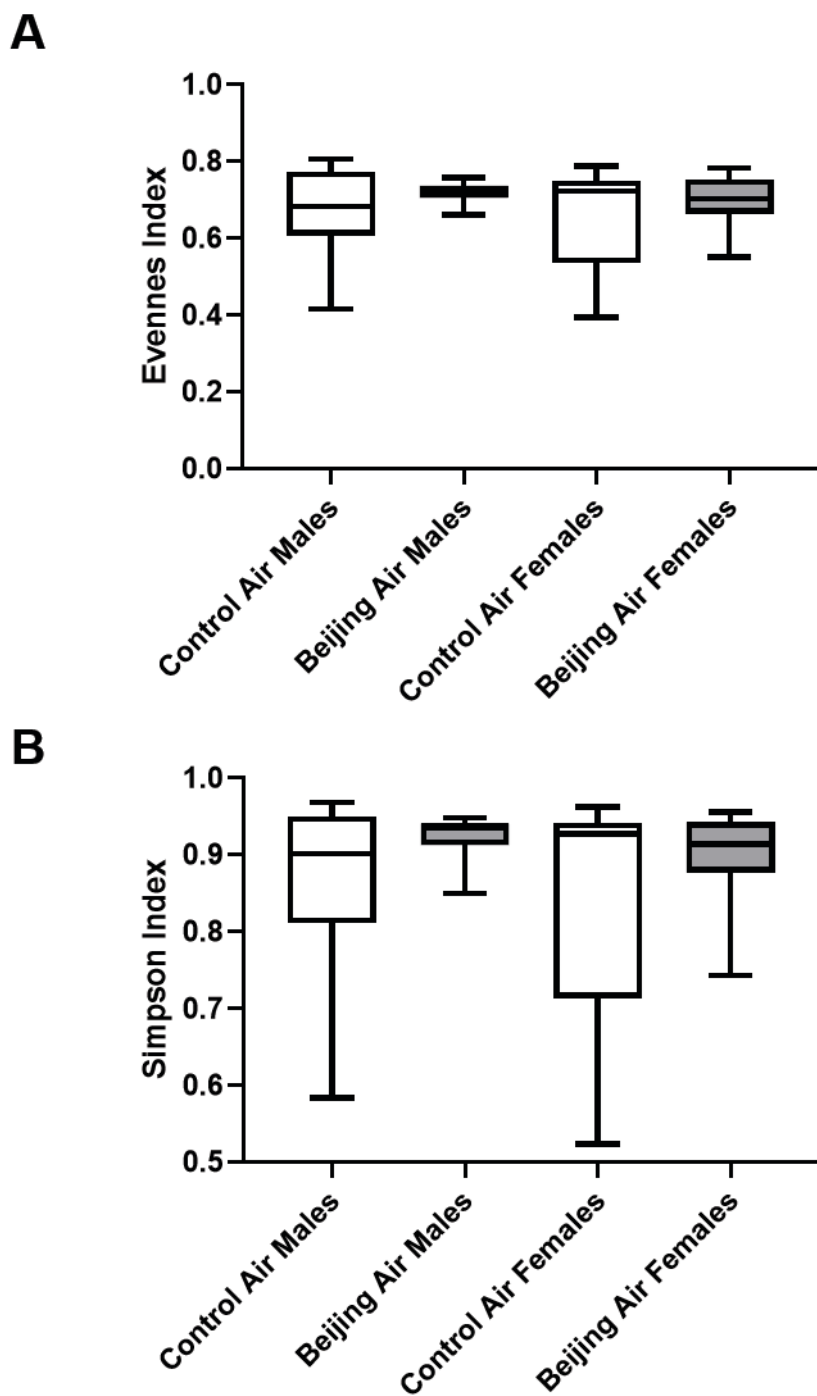
**Fig S2** Dam and pup general outcomes. **A** Litter size. **B** Offspring gender proportion. **C** Dam body weight. **D** Offspring body weight.



### Enteroendocrine markers



**Fig S3** Enteroendocrine cell populations markers in female ileum. Transcript levels of *Tac1*, *Gcg*, *Pyy*, *Gip*, *Nts*, and *Sct* in mice exposed to control air or Beijing-like air (n=10/group).



**Fig S4** Evenness and Simpson  $\alpha$ -diversity index of luminal content microbiota in male and female mice exposed *in utero* to control air or Beijing-like air (n=10/group).

Maturation/differentiation		Male	Female
Proximal colon	Submucosal cellularity		
	Mucosal surface area		
Ileum	Villus length	↘**	
	Crypt depth	↘*	
	Villus/Crypt ratio		
	Vacuole number per villus		
	Mean vacuolated area per villus	↘****	
	Vacuole index	↘***	
	Mean eccentricity index	↘***	
Proximal colon	PCNA positive cells/crypt		
	Lgr5 mRNA		↘**
	Alpi mRNA	↗*	
	Epcam mRNA	↗***	
	Car2 mRNA	↗**	
	Muc2 mRNA	↘*	
	Lyz1 mRNA		
	ChrgA mRNA		
	Pou2f3 mRNA		
	Ass1 mRNA	↘***	
	Fcgrt mRNA	↘*	
	Prdm1 mRNA		
	Lct mRNA	↘*	
	Treh mRNA		
	Arg2 mRNA	↘*	↘*
Sis mRNA	↗*		
Ileum	PCNA positive cells/crypt	↗***	
	Lgr5 mRNA		
	Alpi mRNA		
	Epcam mRNA		↗*
	Car2 mRNA		↗*
	Muc2 mRNA		
	Lyz1 mRNA		
	ChrgA mRNA		↗**
	Pou2f3 mRNA		
	Ass1 mRNA		
	Fcgrt mRNA		
	Prdm1 mRNA		
	Lct mRNA		
	Treh mRNA		
	Arg2 mRNA		
Sis mRNA		↗*	

Inflammation		Male	Female
Proximal colon	Tbx21 mRNA		
	Tnfa mRNA		
	Ifng mRNA		
	Gata3 mRNA		
	Il4 mRNA		
	Il5 mRNA		
	Il13 mRNA		↗**
	Rorc mRNA		
	IL17a mRNA		
	Il22 mRNA		
	Foxp3 mRNA		
	Il10 mRNA	↗***	↗**
	Tgfb mRNA		
Cecum	Tbx21 mRNA		
	Tnfa mRNA		
	Ifng mRNA		
	Gata3 mRNA		
	Il4 mRNA	↗*	↗**
	Il5 mRNA	↗*	
	Il13 mRNA		
	Rorc mRNA	↗***	
	IL17a mRNA	↘*	
	Il22 mRNA	↘**	
	Foxp3 mRNA		
	Il10 mRNA		
	Tgfb mRNA		
Ileum	Tbx21 mRNA		
	Tnfa mRNA		
	Ifng mRNA		
	Gata3 mRNA		
	Il4 mRNA		
	Il5 mRNA		
	Il13 mRNA		
	Rorc mRNA	↗*	
	IL17a mRNA		
	Il22 mRNA		
	Foxp3 mRNA		
	Il10 mRNA		
	Tgfb mRNA		

Permeability markers		Male	Female
Proximal colon	Ocln mRNA		

	Tjp1 mRNA		
	Cldn4 mRNA		↗*
Cecum	Ocln mRNA	↗**	
	Tjp1 mRNA	↘*	↗*
	Cldn4 mRNA	↘**	
Ileum	Ocln mRNA		
	Tjp1 mRNA	↘**	
	Cldn4 mRNA		
	ZO1 (TJP1) protein	↘*	

Colon microbiota		Male	Female
	Chao 1 index		
	Weighted Unifrac index		↘*
	Bacteroidales		↗***
	Coriobacteriales		↗*
	Firmicutes/Bacteroides ratio		↘**

**Fig S5** Table summarizing the endpoints studied and the significant differences observed.

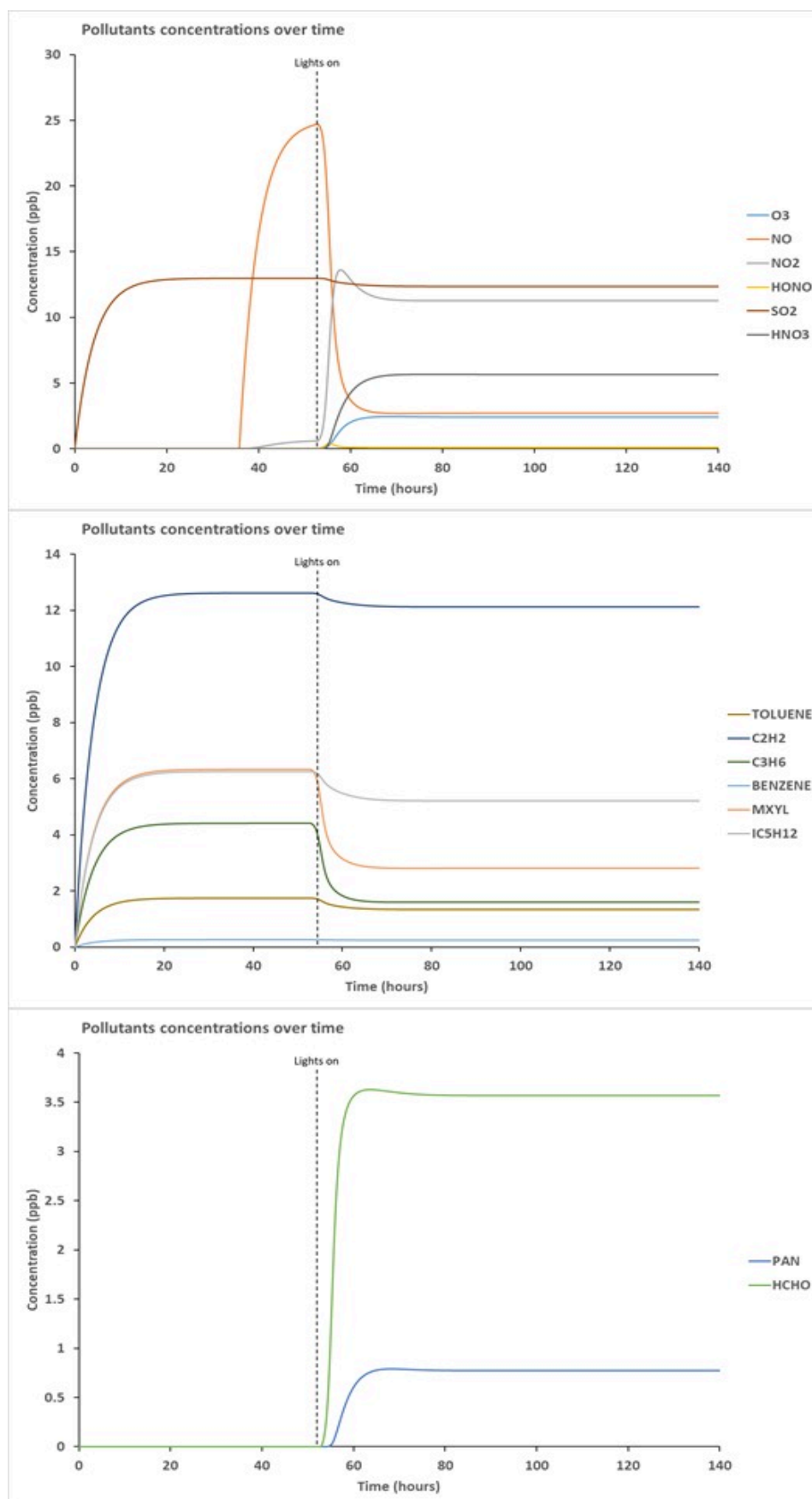
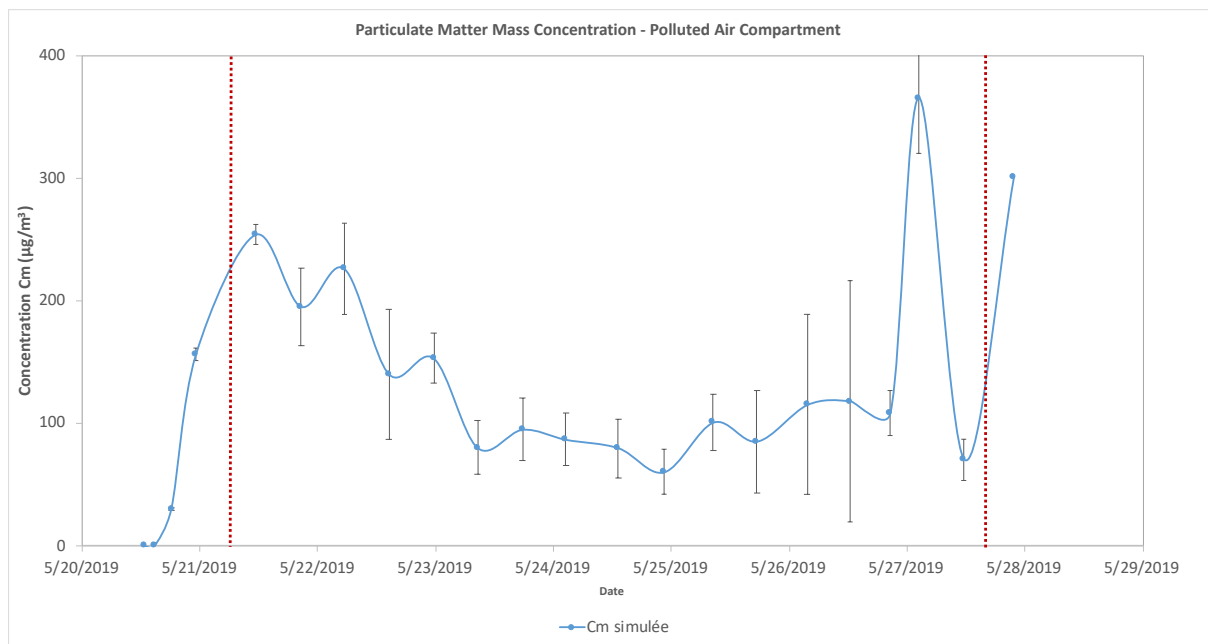


Fig S6 Numerical modelling of the chemical activity inside CESAM chamber.



**Fig S7** Concentration of PM ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) during the experimental campaign. Each day a maximum peak is resulting from injection of soot and dust particles.





# PARTIE III - DISCUSSION



Cette thèse avait pour ambition de déterminer dans quelle mesure l'inhalation de polluants atmosphériques est susceptible de perturber l'homéostasie intestinale. Pour aller plus loin dans la démonstration de la relation d'une exposition par voie respiratoire et de ces répercussions intestinales, nous avons mis en place deux stratégies expérimentales distinctes permettant d'explorer une exposition à deux types de polluants de l'air : i) l'exposition à des nanoparticules manufacturées en mélange afin de mimer un environnement intérieur et/ou professionnel et ii) l'exposition à une pollution intense et complexe de l'air d'un environnement urbain en simulant la pollution atmosphérique de la ville de Pékin. Dans les deux cas, le modèle biologique retenu a été la souris i) au stade adulte et présentant ou non une colite pour l'étude avec les nanoparticules ou bien ii) au stade foetal avec une exposition *in utero*.

Les figures 20 et 21 résument le protocole expérimental et les résultats obtenus.

L'exposition subchronique d'une inhalation à un cocktail de nanoparticules a montré que :

- Lors d'une exposition sur un modèle physiologiquement sain : le cocktail de nanoparticules manufacturées induit une inflammation tissulaire chez le mâle, la composition du microbiote intestinal en est également modifiée chez le mâle et la femelle.
- Lors d'une exposition sur un modèle présentant une colite induite expérimentalement par administration de DSS 2%, le cocktail de nanoparticules manufacturées aggrave la colite chez le mâle et la femelle.
- Lors d'une exposition sur un modèle d'organoïdes intestinaux murins, une cytotoxicité inflammatoire spécifique est observée après avoir testé chacune des nanoparticules individuellement durant 24 heures et à trois concentrations spécifiques.

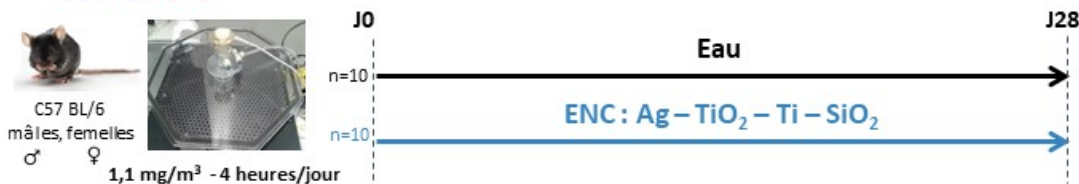
L'exposition *in utero* à une pollution atmosphérique urbaine complexe par inhalation a montré, chez la descendance, que :

- La morphologie intestinale du jeune souriceau mâle est altérée, notamment au niveau du processus de vacuolisation iléale.
- Les processus de différenciation et de prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal, dans le colon et l'iléon, des souriceaux mâles et femelle sont impactés.
- La maturation intestinale du colon du jeune mâle, du colon et de l'iléon de la jeune femelle n'est pas effectuée correctement.
- Une réponse inflammatoire spécifique apparaît dans les différentes parties de l'intestin analysées pour le mâle et dans le colon proximal et le cecum de la femelle.
- La perméabilité intestinale est diminuée.
- La composition du microbiote intestinale est modulée chez la jeune femelle.



# D'UN COCKTAIL DE NANOPARTICULES MANUFACTUREES SUR L'HOMÉOSTASIE INTESTINALE

## In vivo



### CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

jéjunum – colon proximal – colon distal  
 ♂ et ♀

- **Données cliniques**  
 ♂ et ♀ : ∅ MODIFICATION DU POIDS
- **Score de l'infiltrat inflammatoire**  
 ♂ : ↑ SCORE HISTOLOGIQUE INFLAMMATOIRE
- **Marqueurs inflammatoires**  
 RT-qPCR : TNFα, IFNγ, IL18, IL17a, IL22, IL10, Cxcl1  
 ♂ Cp : ↑ TNFα, IL1β, IL10, Cxcl1  
 ♀ J : ↓ TNFα, IL1β, IL22  
 Cd : ↑ TNFα, IFNγ, IL10, Cxcl1  
 J : ↓ tout les marqueurs

**MICROINFLAMMATION TISSULAIRE du ♂**

### CONDITIONS PATHOLOGIQUES

colon ♂ et ♀  
 colite induite par l'administration de DSS 2% dans l'eau de boisson des souris, les 6 derniers jours de l'exposition

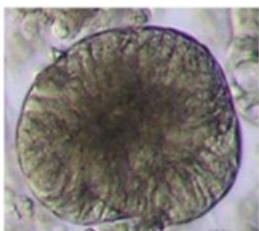
- **Données cliniques**  
 ♂ et ♀ : ↑ PERTE DE POIDS  
 ♀ : ↓ RAPPORT POIDS/TAILLE DU COLON
- **Score de l'infiltrat inflammatoire**  
 ♀ : ↑ SCORE INFLAMMATOIRE
- **Marqueurs inflammatoires**  
 RT-qPCR : TNFα, IFNγ, IL18, Cxcl1  
 ♂ : ↑ IFNγ, CXCL1  
 ♀ : ↑ IFNγ, TNFα

**AGGRAVATION DE LA COLITE ♂ et ♀**

- **Analyse de la composition du microbiote intestinal**  
 Mesure de l'abondance relative des espèces  
 ♀ ↓ Protéobactéries et actinobactéries  
 ♂ ↓ Eggerthellaceae  
 ♂ ↑ Tenericutes  
 ♀ ↑ βdiversité

**COMPOSITION BACTÉRIENNE ALTERÉE DE MANIÈRE SEXE SPÉCIFIQUE**

## In vitro



ORGANOÏDES MURINS INTESTINAUX

Ag ; TiO<sub>2</sub> ; Ti ; SiO<sub>2</sub> individuellement  
 0,02 – 0,2 – 2 μM ; 24heures

- **Marqueurs inflammatoires et alarmines** RT-qPCR
- **Cytotoxicité** test LDH

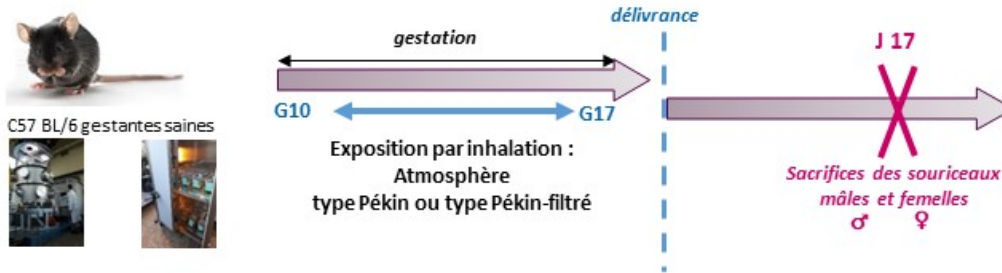
	MARQUEURS INFLAMMATOIRES						ALARMINES	
	TNFα	IL6	Ccl5	Ccl20	Cxcl1	Cxcl10	IL1α	IL33
Ag			0,2	0,02 - 0,2		0,2 - 2	0,2 - 2	0,2 - 2
TiO <sub>2</sub>					0,2 - 2			0,2 - 2
Ti			0,2		0,2 - 2	0,2 - 2		0,2 - 2
SiO <sub>2</sub>	0,02					0,02 - 0,2 - 2		2
	0,02 - 2							

**MODULATION DE LA CYTOTOXICITÉ INFLAMMATOIRE DE MANIÈRE NANO SPÉCIFIQUE**

Figure 20 : Figure récapitulative des effets observés suite à une exposition par inhalation à un cocktail de nanoparticules manufacturées sur l'homéostasie intestinale de souris.



# EFFET D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE À UNE POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE COMPLEXE SUR LE SYSTÈME INTESTINAL DE LA DESCENDANCE



## ANALYSE DE L'INFLAMMATION – EFFETS INTESTINAUX

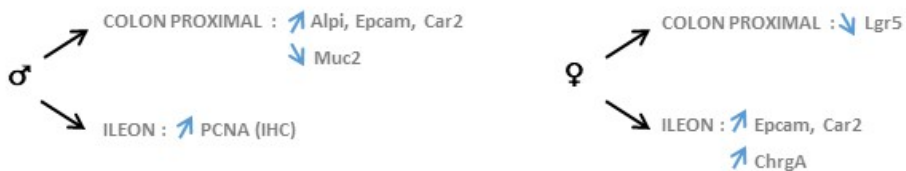
### ➤ Analyse histologique de la morphologie intestinale

Score histologique

- ♂ {
  - ↘ LONGUEUR DES VILLOSITES INTESTINALE + PROFONDEUR DES CRYPTES
  - ↘ VACUOLISATION DE L'ILEON

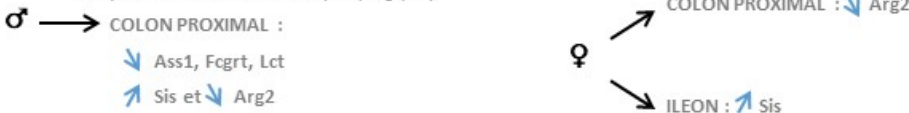
### ➤ Marqueurs de la différenciation et de la prolifération cellulaire

RT-qPCR : marqueur des cellules souches (Lgr5) ; marqueur de prolifération (PCNA) + IHC pour PCNA  
 marqueurs de différenciation cellulaires : cellules absorbatives (Alpi, Epcam, car2), cellules sécrétoires (Muc2, Lgyz1, ChrgA, Pou2f3)



### ➤ Marqueurs de la maturation intestinale

RT-qPCR : marqueurs intestinaux du souriceaux (Ass1, Fcgrt, Prdm1, Lct) ; marqueurs intestinaux de l'adulte (Treh, Arg2, Sis)



### ➤ Marqueurs inflammatoires

RT-qPCR pour Th1, Th2, Th17 et Treg

	♂	♀
COLON PROXIMAL	Treg : ↗ IL10	Th2 : ↗ IL13 ; Treg : ↗ IL10
CECUM	Th2 : ↗ IL4 et IL5 ; Th17 : ↘ RORc, ↘ IL17a, ↘ IL22 ; Treg : ↘ TGFβ	Th2 : ↗ IL4
ILEON	Th17 : ↗ RORc	

### ➤ Perméabilité intestinale

RT-qPCR : Ocln, Tjp1 et Cldn4 + WB pour ZO-1

	♂	♀
COLON PROXIMAL		↗ Claudine (Cldn4)
CECUM	↗ Occludine (Ocln) ; ↘ Zonula Occludens (Tjp1) ; ↘ Claudine (Cldn4)	↗ Zonula Occludens (Tjp1)
ILEON	↘ Zonula Occludens (Tjp1 et ZO1)	

### ➤ Analyse de la composition du microbiote intestinal

Mesure de l'abondance relative des espèces

- ♀ {
  - ↘ βdiversité
  - ↘ ratio Firmicutes/Bacteroidetes
  - ↗ Bacteroidales et Coriobacteriales

## DEVELOPPEMENT INTESTINAL PERTURBÉ MICROINFLAMMATION INTESTINALE



Figure récapitulative des effets observés suite à une exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique complexe sur l'homéostasie intestinale de la descendance de la souris.





Pour étudier les effets de l'exposition par inhalation à la pollution de l'air sur le système intestinal et son microbiote, les modèles *in vivo* apparaissent comme les plus pertinents. Ils vont permettre de rendre compte des différents mécanismes par lesquels les composants de la pollution atmosphérique vont pouvoir agir directement ou indirectement sur l'intestin. Certains composés peuvent avoir un passage systémique ainsi que les particules les plus fines qui vont passer la barrière alvéolo-capillaire, leur permettant d'atteindre l'intestin. D'autres et en particulier les particules les plus grosses vont être dégluties suite à la clairance mucociliaire qui s'opère au niveau des voies aériennes. Enfin, les réactions locales comme l'inflammation pulmonaire peuvent s'étendre à une inflammation systémique susceptible d'affecter l'intestin. Ils permettent d'évaluer les impacts d'une telle exposition à différents niveaux de l'organisme (voies aériennes supérieures et/ou inférieures, impacts sur le TGI, ...). Cette caractéristique biologique donne aux chercheurs la capacité d'étudier l'impact du polluant sur une niche écologique particulière et de mimer et de modéliser au mieux et au plus réaliste les différentes réactions physiologiques de l'organisme sur ces modèles.

Le choix de **l'utilisation de la souris comme modèle animal d'étude** a donc été décidé pour l'ensemble de mes travaux de thèse. La popularité des modèles murins tient en partie au fait que cette espèce animale fait partie de celles pour lesquelles il existe un consensus éthique et une acceptation sociale de son utilisation en expérimentation animale. En outre, la génétique des modèles murins est bien connue et le renouvellement rapide des générations peut conduire à une grande diversité, et à la possibilité de renouveler une étude permettant de multiplier les résultats et de limiter les biais expérimentaux. L'utilisation de modèles murins permet des études expérimentales qui ne sont pas réalisables chez l'humain d'un point de vue éthique quand on explore les effets de nouvelles substances, ou à cause de l'invasivité des techniques de prélèvement, et de l'accessibilité plus restreinte de certains organes. Les modèles murins sont privilégiés dans les études ciblant le système immunitaire intestinal ainsi que le microbiote intestinal.

Ils ont surtout l'avantage de permettre des comparaisons entre des modèles sauvages et sains ou rendus malades par traitement et des modèles génétiquement modifiés pour mimer par exemple des pathologies humaines (prédisposition aux cancers, diabète, obésité, colite...) afin d'étayer les hypothèses de l'implication du microbiote intestinal dans la pathogenèse de ces maladies (451-453).

L'Homme et la souris possèdent des structures anatomiques et une physiologie organique assez similaires en particulier au niveau de leur tractus gastro-intestinal (454). Il existe cependant quelques différences anatomiques entre le TGI humain et le TGI murin : les humains n'ont pas de préestomac et les souris, quant à elles, n'ont pas d'appendice. Elles présentent des cellules en gobelets et des cellules de Paneth qui ne sont pas retrouvées chez l'humain (454).

Le microbiote intestinal murin est également fonctionnellement similaire à celui de l'Homme. Malgré le fait que seulement 4% des gènes du microbiome intestinal soient partagés entre l'Homme et la souris, 95,2% des groupes d'orthologues KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) identifiés sont communs aux microbiomes humain et murin (455). Le microbiote intestinal murin est dominé, comme chez l'Homme, par les phyla des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes*. Néanmoins, malgré cette similitude au niveau du phylum, le microbiote intestinal humain est plus riche et diversifié. Ainsi 85% des genres bactériens retrouvés chez la souris ne sont pas détectés dans l'organisme humain et donc seuls 15 % des genres bactériens dans l'intestin distal de la souris ont été identifiés dans l'intestin humain (456). Chez la souris, les genres les plus abondamment retrouvés sont *Lactobacillus*, *Alistipes*, et *Turicibacter* alors que chez l'Homme ce sont les genres *Prevotella*, *Faecalibacterium*, et *Ruminococcus* (454). Cependant certains genres comme *Clostridium*, *Bacteroides* et *Blautia* sont présents en proportions similaires chez l'Homme et la souris (454). Le microbiote intestinal murin semble être dominé soit par les familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* soit par les familles *Bacteroidaceae* et *Enterobacteriaceae* (457). Un parallèle peut être fait entre cette classification entérotypique effectuée au niveau de la famille chez la souris et celle au niveau du genre chez l'Homme. En effet, les entérotypes murins *Lachnospiraceae/Ruminococcaceae*, et *Bacteroidaceae/Enterobacteriaceae* sont respectivement similaire aux entérotypes humains *Ruminococcus*, et *Bacteroides* (457, 458).

Si d'importantes variations au niveau de la composition sont observées entre le microbiote intestinal de l'Homme et de la souris, ils apparaissent néanmoins fonctionnellement semblables, puisque les mécanismes et les facteurs modulant ces communautés bactériennes semblent être similaires. De nombreuses études sur l'obésité, menées en modèle murin, ont montré que les dysbioses du microbiote intestinal observées chez la souris suivent les mêmes tendances que celles retrouvées chez l'Homme (459, 460). L'utilisation du modèle souris pour l'étude des facteurs influençant la composition du microbiote intestinal paraît donc pertinente. Néanmoins les différences, relevées, dans la composition du microbiote intestinal et l'anatomie du tractus gastro-intestinal peuvent avoir un impact sur la communauté microbienne, l'hôte et les interactions avec l'environnement. C'est la raison pour laquelle, comme tout modèle, le modèle souris a ses limites qu'il faut garder en tête avant toute tentative d'extrapolation à l'Homme.

Nous concluons donc par le fait que les modèles murins permettent de mieux comprendre l'influence des facteurs environnementaux, sur le système intestinal, sur le microbiote intestinal et son implication dans la pathogenèse des maladies, validant donc notre utilisation et notre choix de modèle *in vivo*. Il restera, cependant, important d'examiner, à posteriori les associations établies entre une exposition à la pollution atmosphérique et le microbiote intestinal de l'Homme.

## 2 – Choix du mode d'exposition : répétée ou continue, par inhalation, corps entier

Pour procéder aux expositions par la voie respiratoire, nous avons opté pour une exposition la plus physiologiquement proche d'une exposition humaine, c'est à dire que nous avons exclu les expositions par instillation. Les animaux ont été exposés en « corps entier », c'est-à-dire dans un espace clos dans lequel l'air contaminé est constamment renouvelé afin de simuler au mieux et au plus proche les conditions humaines d'exposition.

## **A - Inhalation des nanoparticules en mélange**

La spécificité de cette étude repose sur le fait que les souris ont été entièrement exposées à ce cocktail dans une chambre d'inhalation, de manière à ne pas impacter et entraver leur libre circulation ainsi que leur liberté de mouvement.

Ce type d'exposition permet de réduire les biais potentiellement retrouvés lors d'une exposition par instillation qui introduit un biais dans le dépôt de la dose qui est apportée en une seule fois et de façon locale, mais aussi l'intervention d'un expérimentateur. Ce protocole permet donc une inhalation classique et physiologique par les souris sans leur induire et leur faire subir des dommages corporels. Certes, un stress peut subsister puisqu'elles se retrouvent enfermées dans une chambre d'inhalation, réduisant leurs champs d'action, de vie et de vision, mais ce stress reste uniforme pour les différents groupes et a moins d'impact que lors d'une exposition par instillation trachéale ou par une inhalation nose-only. De plus, ces deux dernières modalités d'exposition ne permettent pas de faire des expositions consécutives. Ici, nous avons exposé, pendant 5 jours par semaine sur 28 jours, nos souris à un cocktail de nanoparticules et ce 4 heures par jour. Cette durée d'exposition a été déterminée suite à des travaux d'une étude pilote où il avait été démontré que le pic d'exposition à une pollution atmosphérique pouvait être reproduit lors d'une exposition de notre modèle sur 4 heures consécutives (21). En outre, une instillation est un acte isolé et unique, ne permettant pas d'effectuer une exposition physiologique et cumulée à notre air pollué. Notre objectif étant de faire des expositions sur 28 jours, durée classique ou majoritairement utilisée lors d'une étude de toxicité subchronique, il était indispensable de privilégier un dispositif peu stressant pour les animaux et reproductible dans la production de l'aérosol.

L'intérêt de cette thèse était donc d'étudier de manière biologique les effets intestinaux de ce type d'exposition. La pollution de l'air intérieur est un élément important à étudier. L'étude d'Hansen and al, a permis de mettre en évidence les différents types de nanoparticules retrouvées dans les principaux éléments de la vie quotidienne (produits de soins, de sport, ménagers, vêtements, ...) (4) . Ce type de pollution s'insère également dans les différents problèmes de Santé publique puisque présentant des polluants particuliers : les nanoparticules. La spécificité de ce type de pollution est qu'elle ne concerne pas qu'un seul type de population (population professionnelle) mais toute la population, puisque la population générale y est exposée.

C'est donc pour cela, que nous avons simulé, et ce de manière le plus proche possible, en fonction des données établies par la littérature (Hansen and al, 2016 pour le choix des nanoparticules (4) et ; Vance and Marr, 2015 pour la dose (448)), une pollution intérieure aux nanoparticules. L'objectif étant d'étudier les effets d'une exposition par inhalation à ce cocktail de nanoparticules sur des individus sains et des individus présentant une colite pendant un laps de temps, représentatif d'une exposition sub-chronique. Cette exposition a été choisie car nous visions une représentation la plus fiable et fidèle possible à l'exposition humaine. Exposer sur un plus long intervalle de temps nos souris à cette dose plutôt qu'effectuer une exposition fortement concentrée en nanoparticules mais sur un laps de temps très court nous est apparu plus approprié. Notre intérêt et notre aspiration étaient avant tout une étude physio-pathologique des effets des nanoparticules sur le système intestinal et non pas une étude purement toxicologique de ces derniers.

L'utilisation d'une cage d'inhalation permet de contrôler la dose de nanoparticules déposée dans la tête de nébulisation, le débit de nébulisation, et la concentration respirée par les souris dans la chambre. Le protocole expérimental qui a été utilisé a été établi par l'équipe lors d'une étude pilote, où des souris saines ou malades avaient été exposées à des particules de l'air ambiant (PM) (21, 320, 324). Nous avons dans un premier temps validé ce protocole expérimental en effectuant à nouveau une exposition aux PM (travaux préliminaires non présentés ici), puis nous l'avons adapté aux nanoparticules en mélange.

## **B - Exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique simulée**

Dans cette étude, nous avons procédé à une exposition par inhalation en continu pendant 7 jours des femelles gestantes. Grâce à une collaboration avec l'équipe du Docteur Sophie Lanone de l'institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB, U955 Inserm), nous avons eu accès à la chambre de simulation atmosphérique CESAM (<https://cesam.cnrs.fr/>) permettant de réaliser des expositions à une pollution atmosphérique urbaine complexe (pollution particulaire et pollution gazeuse). Les physico-chimistes du LISA (Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques, UMR CNRS 7583) qui gèrent la plateforme Cesam, ont mis leur savoir-faire à profit pour simuler un événement de pollution réaliste qui s'est produit en 2017 à Pékin (461).

Grâce à ce travail collaboratif, nous avons pu exposer les souris à des conditions atmosphériques réalistes de manière totalement innovante et non invasive puisqu'une enceinte d'exposition est adossée à la chambre de simulation. Les souris gestantes étaient placées dans des cages (5 souris gestantes par cage et 4 cages par atmosphère) leur laissant une liberté de mouvement qui permet de réduire le stress de l'expérimentation en particulier chez ces femelles sensibles compte-tenu de leur gestation. Quatre cages de cinq souris ont été exposées à un air pollué et le même effectif a été utilisé pour l'exposition concomitante à l'air contrôle filtré.

Le protocole expérimental de la génération de l'atmosphère comprenait une injection continue de mélange de polluants primaires (principalement des oxydes d'azote, des composés organiques provenant d'un mélange représentatif d'émissions anthropiques, de dioxyde de soufre, de suie, de sels inorganiques et de particules de poussière minérale du désert de Gobi pour simuler un air type Pékin à partir des données obtenues de 2017) à de faibles concentrations (niveaux ppb) dans l'air de la chambre de simulation CESAM fonctionnant en réacteur à flux lent. Les particules d'air simulées dans la chambre restaient durant 4 heures dans la chambre d'inhalation afin de représenter des masses d'air d'échelle régionale. Pendant ce temps, le mélange a été exposé à une irradiation solaire artificielle, permettant aux polluants secondaires tels que l'O<sub>3</sub>, l'acide nitrique, le formaldéhyde, les nitrates de peroxyacétyle (PAN) ainsi que les composés organiques complexes, comme les aérosols organiques secondaires, d'être produits et d'atteindre leur état de stabilité chimique. Les souris ont donc été exposées à des flux constants de ce mélange.

L'événement de smog observé en Chine en 2017 a été un épisode de pollution atmosphérique extrême qui a touché l'est de la Chine, initié par un air lent transportant des émissions industrielles et lors de conditions météorologiques spécifiques (puisqu'il s'est produit en décembre 2017). Des niveaux élevés de PM<sub>2,5</sub> (générés par la combustion du charbon et des sources industrielles) et une faible visibilité ont été observés, entraînant la fermeture d'aéroports, d'autoroutes et d'écoles.

Pour la simulation d'une atmosphère de type Pékin, des COV ont été introduits dans la chambre : particules les plus abondantes et les plus couramment émises dans l'atmosphère urbaine de Pékin à l'époque : isopentane (alcane), propène (alcène), acétylène (alcyne), acétaldéhyde (aldéhyde), benzène, toluène et m,p-xylène (hydrocarbures aromatiques).

Les concentrations ont été déterminées afin d'avoir des niveaux stables de polluants dans la chambre, et représentatifs de l'épisode de pollution. Au bout de 20 heures d'injection des COV, du monoxyde d'azote (NO) a été introduit dans la chambre, puis les lumières ont été allumées, simulant l'irradiation solaire de la troposphère. Afin de simuler de manière réaliste une atmosphère représentative de Pékin, des particules de suie ont été générées à l'aide d'un générateur de suie (min CAST Série 5200, produisant des particules de suie de combustion en utilisant une flamme bien définie simulant la combustion dans les moteurs à combustion modernes), basé sur la combustion du propane. Ces particules ont été transférées dans une chambre plus petite (chambre à réservoir de suie) et ont été injectées une fois par jour dans la chambre CESAM. De plus, durant 1 heure une fois par jour, des particules de poussière minérale ont été injectées. Elles sont produites par un processus d'agitation à partir d'un échantillon du désert de Gobi, dans la chambre (simulant une tempête de sable venue du désert qui a touché Pékin avec un panache de poussière minérale). La concentration maximale de PM au cours de la campagne expérimentale était de  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . L'atmosphère a été surveillée par plusieurs instruments, dont un analyseur de NOx (chimiluminescence, Horiba APNA370) couplé à un analyseur de NO<sub>2</sub> (Teledyne T500U), un analyseur d'O<sub>3</sub> (spectroscopie UV, Horiba APOA370), un analyseur de SO<sub>2</sub> (Horiba APSA370), un in- FTIR in situ (Bruker Tensor 37), et pour les particules un SMPS (TSI 3080 + TSI3025), un aérosol diffusant la lumière (Palas Welas Digital 2000) et un moniteur de spéciation chimique des aérosols (Aerodyne) pour la spéciation des aérosols. Le tableau ci-dessous donne un aperçu des polluants définis comme référence pour qualifier une simulation d'atmosphère « à la pékinoise ». Cela montre à quel point l'environnement atmosphérique auquel les souris ont été exposées est complexe (des dizaines de polluants, aussi bien en phase aérosol que gazeuse), et représentatif de la situation urbaine de Pékin en décembre 2017 (la plupart des polluants de référence sont présents en relative abondance relative de manière similaire à la plage ciblée).

La composition de cette atmosphère a été reproduite au plus proche de celle retrouvée in situ, afin de pouvoir étudier les impacts intestinaux dans la descendance suite à une exposition gestationnelle permettant par la suite d'effectuer facilement des parallèles et extrapolations envisageables avec l'organisme humain.



	Pollutants or components	Observed mean concentration	
Gaseous Pollutants	Ozone - O <sub>3</sub> (ppb)	6.34 ± 3.59	
	Nitrogen monoxide - NO (ppb)	2.98 ± 2.19	
	Nitrogen dioxide - NO <sub>2</sub> (ppb)	10.33 ± 4.56	
	Sulfur dioxide - SO <sub>2</sub> (ppb)	5.11 ± 2.65	
Particulate Pollutants	<b>PM<sub>2.5</sub></b>		
	Particle number concentration (part/cm <sup>3</sup> )	2 000 - 10 000	
	Particle mass concentration (µg/m <sup>3</sup> )	105.46 ± 50.34	
	<b>Aerosol chemical composition indicators</b>		
	Sulfates (µg/m <sup>3</sup> )	5 - 8	
	Nitrates (µg/m <sup>3</sup> )	5 - 10	
	Ammonium (µg/m <sup>3</sup> )	3 - 7	
	Organic carbon (OC) (µg/m <sup>3</sup> )	15 - 25	
	Black carbon (BC) (µg/m <sup>3</sup> )	3 - 5	
Gaseous Pollutants	Formaldehyde - HCHO	Identified by PTR-MS	
	Acetaldehyde - CH <sub>3</sub> CHO	Identified by PTR-MS	
	Acetone - C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Identified by PTR-MS	
	Methylglyoxal or 2-oxopropanal - C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Identified by PTR-MS	
	Glyoxal or ethanedial - CHOCHO	Identified by PTR-MS	

**Tableau :** Niveau des polluants atmosphériques attendus et observés lors d’un épisode de pollution de type Pékin de Décembre 2017

Notre étude est totalement innovante car jusqu’à présent les études qui cherchaient à établir un lien entre l’exposition aux particules de l’air et une dysbiose intestinale ont utilisé des modes d’exposition très différents. Beaucoup d’études se sont notamment limitées à la phase particulaire et l’administration des particules (PM) est souvent faite par la voie orale (281, 320, 324). Ces études ont eu le mérite de montrer que les PM peuvent induire directement une inflammation intestinale (324). Cependant, elles sont basées sur l’hypothèse que les particules accèdent à l’intestin via le processus de la clairance mucociliaire ou encore par le léchage des PM déposées sur le pelage, qui n’est pas une voie représentative de l’exposition chez l’Homme. Les particules les plus fines peuvent passer la barrière air-sang et ensuite se biodistribuer. De plus, l’induction d’une inflammation pulmonaire par les PM peut aussi conduire à une inflammation systémique. La caractérisation du dialogue poumon-intestin induite par la pollution atmosphérique nécessite d’une part d’utiliser des modèles d’inhalation et d’autre part de privilégier une exposition à la globalité de cette pollution comme nous avons pu le faire avec la chambre de simulation.

### 3 – Choix du type de pollution et des populations cibles :

#### A - Inhalation des nanoparticules en mélange :

La particularité de notre étude repose sur le fait que nous avons décidé d'évaluer les effets des EN les plus présentes dans l'air en mimant un mélange d'EN. Le choix des NP à utiliser a été fait à partir de l'étude de Hansen and al, qui ont établi un inventaire en ligne de produits contenant des nanomatériaux ou basés sur la nanotechnologie. Ainsi, il est ressorti que pour l'inhalation, l'argent (**Ag**) est la nanoparticule la plus répandue, suivi du titane (**Ti**), du dioxyde de titane (**TiO<sub>2</sub>**) et du dioxyde de silicium (**SiO<sub>2</sub>**) (4). L'augmentation constante de la production de nanomatériaux accroît le risque d'exposition et ce notamment par la voie aérienne. Leur présence dans les organismes humains souffrant de pathologies digestives est déjà attestée. Des nanoparticules de compositions diverses ont été retrouvées dans les biopsies coliques de patients atteints de rectocolite hémorragique, de la maladie de Crohn et du cancer du côlon (462) et mais également dans des biopsies de patients atteints de cancer colorectal, sans que la voie par laquelle l'exposition s'est produite soit identifiable.

L'essentiel des travaux qui se sont intéressés aux effets intestinaux des NP manufacturées inhalées, a été réalisé en étudiant des types de NP différentes et de manière isolée. Ils ont permis de montrer que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (341) ou d'Ag (342) inhalées pouvaient être dirigées vers le tractus intestinal via le processus de clairance mucociliaire, grâce à leur détection dans les matières fécales. Nous avons fait le choix d'utiliser un **mélange de NP** représentatives pour approcher des situations qui pourraient être rencontrées en milieu intérieur que ce soit en milieu professionnel ou non. En plus de l'exposition à chacune de ces EN qui peut être élevée sur le lieu de travail, une exposition chronique à plus ou moins forte dose de la population générale à ces EN peut également se produire. Il est donc important d'évaluer les effets sanitaires d'une telle exposition, et notamment sur les tissus intestinaux qui sont de plus en plus reconnus comme une cible non négligeable des particules inhalées (233, 463).

Les souris adultes ont été exposées 4 heures/jour, 5 jours/semaine pendant 28 jours au mélange des 4 EN à la concentration totale de 1 mg/m<sup>3</sup> pour chacune des nanoparticules. Les concentrations d'EN dans l'air sont peu documentées.

Nous avons donc choisi de travailler à la concentration de 1,1 mg/m<sup>3</sup> pour chaque NP, bien qu'il ne soit pas actuellement possible d'évaluer la pertinence de cette concentration pour l'exposition humaine (448).

**Cette concentration a été établie et choisie en référence aux travaux de Vance and al, qui ont démontré que l'OEL pour le dioxyde de titane était de 1 mg/m<sup>3</sup>. C'était la seule dose de référence que nous possédions sur ces nanoparticules. Nous avons donc utilisé cette dernière pour nos quatre nanoparticules.** L'étude a non seulement été réalisée sur des **souris adultes saines** mais également sur des **souris présentant une colite** induite par administration de Dextran Sodium Sulfate.

Ce dernier modèle expérimental est un modèle pathologique, mimant une colite induite chimiquement. Sa sévérité peut être suivie cliniquement et estimée par un suivi de poids des animaux, une observation de la consistance des selles et une observation du comportement des souris. Ce modèle n'est pas invasif, puisque le DSS est administré dans l'eau de boisson des souris. Un pourcentage de 2% est suffisant pour induire une colite sur un intervalle de plus ou moins 7 jours, intervalle de temps au-delà duquel il n'est pas acceptable éthiquement de poursuivre le traitement car la perte de poids peut être inférieure au 85% du poids initial. Ce modèle est facile à mettre en œuvre et est très reproductible. Il permet de mimer une inflammation du colon, ce que nous recherchons ici. De plus, nous avons préalablement utilisé ce modèle pour une étude préliminaire lors d'une exposition à des PM : il s'était révélé tout à fait approprié pour simuler cette colite et observer les potentiels effets induits par les PM. Nous avons constaté que l'inflammation moléculaire et histologique était retrouvée et une potentielle aggravation de cette dernière également. Ce modèle murin permet d'étudier les effets d'une inhalation d'un cocktail d'EN sur un organisme présentant une altération de l'homéostasie intestinale, autrement appelée une prédisposition au développement de MICI et de déterminer s'il présente une plus grande sensibilité comparativement à un modèle physiologiquement sain.

Enfin, nous avons choisi dans ces deux types d'exposition d'effectuer des analyses sur des mâles et des femelles suspectant des effets dépendants du sexe, puisqu'il est fréquemment rapporté dans la littérature que de nombreux polluants agissent de manière sexe dépendante.



## **B - Exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique simulée :**

L'utilisation d'une chambre de simulation atmosphérique nous a permis d'explorer les effets d'une exposition réaliste à la pollution de l'air urbain sur les tissus intestinaux de l'allaitement au sevrage suite à une exposition *in utero*. Comme dans notre autre étude, nous avons analysé les effets sur les deux genres.

Outre une exposition à une pollution atmosphérique simulée dans sa globalité, l'autre originalité de cette étude a été de cibler **une exposition pendant la gestation**. Ce choix a été guidé par des travaux épidémiologiques récents qui soulignent que l'exposition à la pollution atmosphérique a des effets qui ne sont pas limités à la sphère cardio-respiratoire mais impactant plus largement d'autres organes et notamment l'embryon/foetus en développement. Ainsi, il a été montré, récemment, que la pollution de l'air peut affecter le développement du fœtus suite à une exposition de la mère pendant la grossesse, entraînant une naissance prématurée, un faible poids à la naissance, un retard de croissance et potentiellement des effets cardiovasculaires et respiratoires indésirables (464). D'autres études épidémiologiques ont montré un lien entre une exposition *in utero* à la pollution de l'air et la prévalence de maladies intestinales infantiles (319). Mais la plausibilité biologique de ces observations nécessite des investigations toxicologiques poussées telles que celles que nous avons mises en œuvre.

Par ailleurs, il apparaît de plus en plus certain, qu'il existe une fenêtre d'exposition spécifique durant la gestation contribuant au développement de pathologies à la naissance, lors de la petite enfance et même à l'âge adulte. Il a été observé que l'exposition à la pollution de l'air tôt dans la vie est directement liée au développement de risques cardiovasculaires majeurs, notamment l'hypertension, l'obésité et les troubles métaboliques (346-351). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'exposer les souris gestantes du 10<sup>e</sup> jour de gestation (GD10) au 17<sup>e</sup> jour de gestation (GD17). Cette période d'exposition est concomitante au développement du système pulmonaire et intestinal du fœtus de la souris. Le développement du système pulmonaire débute **au 9<sup>ème</sup> jour de gestation et celui du système intestinal au 10<sup>ème</sup> jour** de gestation (465). Leur développement est concomitant, c'est pourquoi l'exposition a été effectuée sur cette période et jusqu'à la mise à bas de la souris gestante.

Pour l'observation des effets induits dans la descendance, nous avons choisi d'étudier la période de la transition allaitement-sevrage (au 17<sup>e</sup> jour postnatal). C'est une période clé pour l'intestin au cours de laquelle des processus de prolifération, différenciation et maturation de l'épithélium intestinal s'opèrent pour établir le développement structurel et immunitaire de l'intestin (466, 467). Chez la souris comme chez l'Homme, le développement intestinal débute juste avant la naissance et la maturation intestinale s'achève environ trois semaines après la naissance lors de la transition allaitement-sevrage (468). Ainsi une exposition prénatale peut induire des changements dans la colonisation bactérienne pendant la période périnatale et déclencher une dérégulation de la réponse inflammatoire induite par le système immunitaire (399) (469, 470). Une étude épidémiologique en population humaine a mis en évidence qu'une exposition à des polluants ayant un potentiel oxydatif (désignés par Ox : valeur moyenne du potentiel red-oxy de NO<sub>2</sub> et O<sub>3</sub> et pondérée à chacun des polluants) au cours du deuxième trimestre de la grossesse est associée au développement d'une maladie inflammatoire de l'intestin (319). Chez la souris, l'exposition aux PM<sub>2,5</sub> pendant la gestation a entraîné des altérations dans la distribution et la structure du microbiote intestinal des mères (471).

L'exposition à la pollution atmosphérique *in utero* a été associée à l'apparition et au développement de l'asthme infantile et aux maladies allergiques (472, 473). De plus, l'augmentation des niveaux ambiants d'O<sub>3</sub>, de NO<sub>2</sub>, de PM<sub>2,5</sub> et de SO<sub>2</sub> a été associée à une augmentation des taux d'hospitalisations pour de l'asthme infantile (474-477).

Ko et ses collègues, ont établi et recensé une relation entre les admissions quotidiennes à l'hôpital pour des urgences asthmatiques et les indices d'air pour certains polluants (niveaux de SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, PM<sub>10</sub> et PM<sub>2,5</sub>) au sein de 15 grands hôpitaux de Hong Kong entre janvier 2000 et décembre 2005 (476). Il est important de noter que les effets néfastes d'une exposition à la pollution de l'air au début de la vie pourraient durer longtemps et se traduire par l'apparition de maladies inflammatoires, respiratoires ou cardiovasculaires lors de l'évolution de la vie.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les individus atteints de maladies de type allergie respiratoires ou atteignant le tractus des voies aériennes sont prédisposés au développement de maladies intestinales. Un individu présentant dès la naissance des atteintes pulmonaires

et/ou intestinales peut donc développer par la suite ce type de maladies. Il est donc intéressant d'observer et d'étudier l'impact des expositions *in utero* sur le développement du tractus intestinal et respiratoire (dans un second temps) pour mettre à nouveau en évidence l'impact et l'importance de l'axe poumon-intestin. En outre, le développement TGI et de l'arbre pulmonaire s'effectuent sur la même période de vie embryonnaire : au 9,5<sup>ème</sup> jours de vie embryonnaire la mise en place des branches pulmonaires avec la morphogenèse et le développement de ces dernières apparait (465), la prolifération de l'épithélium et du mésenchyme permet l'élongation du tube digestif et augmente sa circonférence, son contenu luminal et sa longueur intestinale (478).

Ces études démontrent donc qu'une exposition *in utero* ou au début de la vie à des produits chimiques, des polluants peut affecter la composition du microbiote entérique, impacter la physiologie de l'hôte et par conséquent, potentiellement prédisposer à une altération du système intestinal et de son homéostasie, entraînant la survenue et le développement de pathologies intestinales.





## Les polluants inhalés impactent l'homéostasie intestinale

L'intestin est constitué de différentes sections ayant des structures différentes et des fonctions spécifiques. Chacune forme une niche écologique particulière hébergeant des populations bactériennes spécialisées susceptibles de réagir différemment aux perturbations comme celles induites par un toxique. C'est la raison pour laquelle, nous avons dans les deux études, caractérisé l'impact des deux atmosphères étudiées, sur l'homéostasie intestinale au niveau du jéjunum, de l'iléon, du cecum, du côlon proximal et du côlon distal chez le mâle et la femelle.

### 1 – L'inhalation de polluants altère le système immunitaire intestinal :

#### **A - Dommages et altérations histologiques**

##### **a - Inhalation des nanoparticules en mélange :**

L'évaluation de l'inflammation par une approche histologique n'a révélé aucune différence même si une tendance à l'accentuation du score inflammatoire était observée dans le jéjunum. Ces résultats montrent que l'inhalation du mélange EN n'induit pas de dommages drastiques dans les tissus intestinaux lors d'une exposition sur un modèle animal physiologiquement sain. Par contre, chez les animaux présentant une colite induite par le DSS, il est observé une aggravation de l'intensité de celle-ci chez les souris mâles et femelles exposées, avec un score histologique de la colite accentué chez la femelle. L'analyse des données cliniques et biologique montre aussi une perte de poids accentuée chez les femelles dès le quatrième jour. Ces effets cliniques accentués chez les mâles apparaissent dès le troisième jour. Ces données suggèrent que l'inhalation d'ENM pourrait aggraver les dommages histologiques intestinaux chez les sujets prédisposés ou sensibles au développement de la colite, pouvant conduire à la pathogenèse de maladies inflammatoires comme les MICI.

## **b - Exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique simulée: :**

### **1/ Différenciation, prolifération et maturation intestinale modulée**

Chez le jeune mâle, exposé *in utero*, on a constaté une altération dans la maturation et la formation du système intestinal. En effet, l'exposition a induit des altérations histomorphologiques de l'iléon, et particulièrement des perturbations du processus de vacuolisation (remplacement de l'épithélium vacuolé de type foetal par un épithélium non vacuolé de type adulte). De plus, des paramètres histologiques, spécifique du développement intestinal, sont modifiés. On assiste à une réduction de la longueur des villosités et de la profondeur des cryptes dans l'intestin grêle, à la prolifération accrue des cellules épithéliales de l'iléon et à la diminution de la taille et des altérations morphologiques des vacuoles iléales. Ces observations sont confortées par une augmentation du marqueur de prolifération épithéliale, PCNA, dans l'iléon. Ces résultats tendent à confirmer **l'apparition d'une maturation intestinale précoce induite par un processus de vacuolisation iléale accentuée**, suite à cette exposition *in utero* (479).

### **2/ Perméabilité intestinale modulée chez le souriceau**

L'altération du système immunitaire intestinal se traduit également par une altération de sa fonction de barrière. Pour qu'elle soit efficace, la barrière présente une régulation adaptée des jonctions serrées qui scellent les contacts entre les cellules épithéliales et régulent le passage paracellulaire des solutés (480).

Dans nos travaux chez le mâle, i) le caecum présentait des variations géniques des trois marqueurs de perméabilité intestinale : Occludine à la hausse, Zonula Occludens et Claudine à la baisse, ii) l'iléon présentait une altération de l'expression du marqueur de perméabilité ZO-1, spécifiquement au niveau génique et protéique iii) le colon proximal ne présentait pas de changements d'expression de ces marqueurs. L'exposition *in utero* induit donc une altération de l'expression des protéines de jonction de type Zonula Occludens, pouvant conduire à un défaut de fonctionnement de la barrière intestinale et induire une fuite ou une entrée non voulue de pathogènes dans la lumière intestinale. Le caecum montre, quant à lui, une compensation de la perte d'expression des Zonula Occludens et des Claudines par un mécanisme de surexpression des Occludines, visant à contrecarrer cette perméabilité induite par la pollution atmosphérique.

Chez les femelles, c'est une surexpression des transcrits des Claudines pour le colon proximal et des Zonula Occludens pour le caecum qui a été observée. Dans un intestin sain, la barrière intestinale limite la translocation des microbes dans la lumière intestinale, évitant ainsi son transfert dans la circulation, sa dissémination dans l'organisme et le déclenchement d'une réaction inflammatoire (517).

Nos résultats sont en cohérence avec les travaux de Mutlu et al (2011) qui ont également montré que suite à une exposition aux particules de l'air, par gavage, une diminution de la perméabilité de la barrière épithéliale était observée dans le petit intestin, avec une diminution de l'expression de ZO-1. La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) alors induite, entraîne une inflammation intestinale (324). Lors de l'augmentation de la perméabilité intestinale, un afflux de particules et de produits microbiens dans la lamina propria a lieu, une inflammation tissulaire apparaît (231, 235).

## **B - Une réponse inflammatoire spécifique est induite**

### **a - Inhalation des nanoparticules en mélange**

Chez le mâle sain, l'expression de certaines cytokines inflammatoires est modulée par l'exposition au cocktail de nanoparticules traduisant une micro-inflammation. En effet, les marqueurs inflammatoires analysés étaient tous modulés à la baisse dans le jéjunum et certains à la hausse dans le colon proximal et distal. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Lamas et son équipe qui avaient réalisé une exposition orale à un cocktail de trois nanoparticules (TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> et Ag) (481).

Chez les souris femelles, on constate aussi une microinflammation même si moins de marqueurs se trouvent être modulés.

On peut suggérer que cette microinflammation soit le résultat de la présence des NP dans le tissu épithélial. En effet, la présence de nanoparticules de compositions diverses a déjà été observées dans les biopsies coliques de patients atteints de rectocolite hémorragique, de la maladie de Crohn et du cancer du côlon (462) ainsi que dans des biopsies de patients atteints de cancer colorectal des nanoparticules. De même, après avoir été exposés à de la poussière de toner d'imprimante laser, des particules de toner dans le péritoine des travailleurs exposés et leurs biopsie colique indiquait que l'intestin était enflammé (482).

Il serait intéressant d'exploiter les organes récupérés et conservés dans des solvants permettant de les fixer pour effectuer des explorations plus poussées en microscopie électronique couplée à de l'analyse élémentaire afin de rechercher la présence de NP dans nos échantillons d'intestin issus d'animaux exposés.

Les raisons pour lesquelles les effets possibles de l'ENM inhalé sur le tractus gastro-intestinal ont été négligés jusqu'à présent sont probablement dû au fait qu'il manque de données épidémiologiques prouvant des effets gastro-intestinaux pertinents chez les travailleurs inhalant des particules de plus grande taille. Il serait donc intéressant d'observer si les caractéristiques physico-chimiques acquises suite aux interactions le long du tube digestif (le degré d'agrégation ou d'agglomération ...), influencent la toxicité de ces NP. Evaluer qui sont les inducteurs les plus puissants dans la modification des caractéristiques des EN, et, étudier si tout le cocktail des nanoparticules est modifié dans le milieu gastro-intestinal, ou si seulement certaines nanoparticules sont soumises à de telles modifications serait très intéressant et permettrait de mieux comprendre et mieux cibler les effets inflammatoires et les mécanismes induits (483).

Les études *in vivo*, en revanche, peuvent fournir des informations concernant la toxicocinétique des EN dans le tractus gastro-intestinal, et les tissus extra-intestinaux. Notre étude nous permet de compléter les études *in vivo* présentant les effets de ces EN, en s'affranchissant des problèmes d'extrapolation des résultats dus à l'utilisation de doses généralement plus élevées (notre dose choisie est ici en relation avec les LEO : limite d'exposition professionnelle), à des études effectuées sur du court terme sur des modèles animaux (ici, notre étude est effectuée en condition sub-chronique : 28 jours). Notre étude présente en effet, de véritables conditions d'exposition à « long » terme et à « faible » dose subies de manière générale dans les milieux de vie et de travail et donc représentative de la réalité atmosphérique humaine.

Chez les souris atteintes de colite induite, l'inhalation répétée d'ENM a provoqué une régulation positive de certains marqueurs inflammatoires chez le mâle et la femelle confortant les observations histologiques évoquées plus haut.

La mise en évidence de l'induction d'une microinflammation et de l'exacerbation de la colite par l'inhalation répétée à un mélange de NP, ouvre à la poursuite d'analyses mécanistiques afin de comprendre le mécanisme inflammatoire induit, les populations cellulaires immunitaires impliquées et les voies de signalisation activées ou réprimées...

### **b - Exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique simulée :**

Nous avons mis en évidence que l'exposition *in utero* à la pollution de l'air impacte le système immunitaire intestinal puisque l'expression de certaines cytokines se trouve exacerbées ou diminuées induisant ainsi une réponse immunitaire spécifique. Nous avons analysé l'expression d'un large panel de marqueurs génétiques (facteurs de transcriptions ou cytokines inflammatoires) spécifique des différentes réponses inflammatoires, Th1, Th2, Th17, Treg afin de définir celle induite par cette exposition gestationnelle.

Quel que soit le sexe, les souriceaux sur-expriment la cytokine immunomodulatrice IL-10 dans le côlon. Cette cytokine anti-inflammatoire est impliquée dans le contrôle de la bonne réponse bactérienne. La surexpression de cette cytokine pourrait provenir d'un dysfonctionnement de ces cellules productrices (macrophages, les cellules T, les cellules B, ...) bloquées au stade de production d'IL 10, entraînant alors son accumulation, sa surexpression, et aboutissant à une réponse inflammatoire dérégulée. Par contre, quel que soit le sexe, les souriceaux présentent peu de modulation des différents marqueurs inflammatoires dans leur colon proximal et aucune dans leur iléon.

Chez les souriceaux mâles, on observe dans leur caecum, une augmentation de deux facteurs de transcription immunitaire majeurs (Tbx21 et Rorc), une surexpression de deux cytokines Th2 (Il4 et Il5), et une sous-expression des cytokines (Il17a, Il22 et Tgf $\beta$ ). La production d'IL-17a et d'IL-22 à faible niveau permet le maintien de l'homéostasie immunitaire dans l'intestin. Tout comme pour l'IL10, une modulation de l'expression de ces cytokines inflammatoires peut être due à un problème de maturation ou d'expression des cellules productrices de ces cytokines, induisant une réponse inflammatoire spécifique permettant le recrutement des cellules inflammatoires nécessaire à la réaction locale. Cette exposition *in utero* semble induire une modulation de l'ensemble des réponses inflammatoires dans le caecum du souriceau mâle exposé.

Cette régulation de l'ensemble du système immunitaire peut finir par échapper aux mécanismes de contrôle de la stabilité immunitaire, et devenir incontrôlable aboutissant alors à une altération de l'homéostasie intestinale.

Les résultats évoqués ci-dessus, concordent avec plusieurs études dont celle de Kish et son équipe qui a démontré que suite à une exposition à des particules atmosphériques par gavage, la réponse inflammatoire de l'iléon était différente de celle du côlon (320). En effet, dès 7 jours d'exposition, une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires était observée dans l'intestin grêle. La réponse inflammatoire apparaît plus tardivement dans le colon puisqu'une exposition de 35 jours est nécessaire afin d'observer les mêmes effets au niveau colique. De même, une inflammation plus importante au niveau de l'iléon murin a également été observée lors d'une surexposition à la fumée de cigarette (484). L'intestin grêle est le premier segment du tractus gastro-intestinal permettant le métabolisme des xénobiotiques, notamment par l'action d'enzymes spécifiques comme les CYP450 (485). Le côlon pourrait potentiellement être protégé de la toxicité induite par l'exposition à ces molécules extérieures et à leurs réactions oxydatives associées, suite à la forte activité des enzymes anti-oxydantes présentes dans l'intestin grêle.

Une explication alternative aux réponses différentes selon les parties de l'intestin, peut être la présence de la couche de mucus qui est quatre fois plus épaisse au niveau du colon qu'au niveau de l'intestin grêle (486) et qui ne présente pas la même structure. Elle est organisée en deux parties : une interne qui adhère étroitement à l'épithélium, imperméable aux bactéries, une partie plus externe moins réticulée et perméable aux bactéries. L'intestin grêle présente une mucine qui forme un gel soluble unique, la couche ainsi formée n'adhère pas à l'épithélium et est totalement perméable aux bactéries (43). La pénétration de bactéries pro-inflammatoires semblerait donc être particulièrement facilitée au niveau de l'iléon. Ceci pourrait expliquer les résultats obtenus au niveau iléal chez les souriceaux mâles qui présentent une perméabilité iléale altérée. Enfin, la disponibilité en oxygène est plus importante au niveau de l'iléon qu'au niveau du côlon (487). L'action des communautés bactériennes nécessitant un environnement de type aérobie pourrait donc être facilitée au niveau iléal et pourrait également induire une plus forte réaction inflammatoire.

## **C - Modulation du microbiote intestinal**

Le microbiote intestinal joue un rôle vital dans l'organisme par son implication dans les processus métaboliques et immunitaires. Une relation spécifique s'établit entre l'hôte et le microbiote avec des échanges de métabolites (348, 488), la dégradation des glucides alimentaires complexes (489), et la synthèse des vitamines (490). Par ces actions, il peut augmenter ou diminuer la toxicité des xénobiotiques pour l'hôte, et avoir sa composition altérée par ces derniers. L'intérêt pour l'impact des polluants, notamment inhalés, sur le système immunitaire intestinal est croissant puisque qu'entre 2015 et 2020 la littérature scientifique est passée de 4 à 22 publications sur PubMed avec les mots clefs « air pollution » et « gut ». Ainsi des travaux suggèrent que l'exposition aux polluants atmosphériques peut impacter l'apparition et le développement de maladie comme les maladies métaboliques (l'obésité et le diabète de type 2) par une altération du microbiote intestinal (349, 350). En outre, il a déjà été démontré que l'exposition à la pollution de l'air est liée au développement de maladies gastro-intestinales, y compris les MICI (16, 17, 320). En 2014, une revue de la littérature a relaté les preuves établissant un lien entre l'exposition aux polluants atmosphériques avec le microbiote intestinal et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (231). Dans ce contexte nous avons dans nos deux axes d'études, porté une attention particulière à la composition du microbiote.

### **a - Inhalation des nanoparticules en mélange**

Nous avons observé que les mâles exposés au mélange (Ag, Ti, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) présentait une diminution de l'abondance du phylum *Tenericutes*, de la classe *Mollicutes*, ainsi qu'une plus faible abondance de la classe des *Coriobacteriia*, de l'ordre des *Coriobacteriales* et de la famille des *Eggerthellaceae*. Chez les femelles exposées, une réduction du phylum des *Protéobactéries*, de la classe des *Deltaprotéobactéries* et de l'ordre des *Desulfovibrionales* a été observée. Tout comme pour les mâles, leur microbiote caecal présentait moins de quantités du phylum *Actinobacteria*, de la classe *Coriobacteriia*, de l'ordre *Coriobacteriales* et de la famille *Eggerthellaceae*.

L'index de diversité, permettant de comparer la présence ou l'absence des organismes bactériens observé dans le microbiote intestinal, est augmenté dans les deux sexes exposés par rapport aux souris contrôles. Il y a donc une évolution dans la diversité microbienne qui s'établit après une exposition au mélange d'EN, induisant une augmentation du nombre de populations bactériennes différentes. Il est connu que les *Tenericutes* et *Mollicutes* sont majoritairement constitutives d'un microbiote intestinal sain. La diminution de leur proportion chez le mâle laisse donc à penser qu'une altération de la physiologie intestinale apparaît. En effet, cette diminution s'observe dans le microbiote de souris présentant une colite induite par administration de TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) ou après une exposition à un polluant métallique (491). Les patients atteints de la maladie de Crohn ou d'une rectocolite hémorragique présentent aussi une diminution des *Tenericutes* et *Mollicutes* (492, 493).

Les bactéries de l'ordre *Desulfovibrionales* sont moins abondantes dans le microbiote des femelles. On sait qu'elles sont retrouvées dans les tissus iliaques de patients atteints de la maladie de Crohn mais pas dans les tissus de patients sains (494). Sa forte prévalence dans le microbiote intestinal est corrélée avec la survenue de maladies neurodégénératives comme Parkinson (495). La baisse de cette population dans le microbiote des femelles pourrait s'expliquer par le fait que cette population a été sensiblement diminuée au profit d'une autre population de *Proteobacteria* ou qu'elles se retrouvent en plus forte quantité dans le tissu iliaque de la souris. Les EN semblent donc induire une diminution de l'expansion de cet ordre de *Protéobactéria*. Cela pourrait conférer une protection contre le développement d'une maladie neurodégénérative si l'on se réfère au lien établi entre ces bactéries et ces pathologies (505).

Enfin le microbiote intestinal du mâle et de la femelle présente une diminution des bactéries de la famille des *Eggerthellaceae*. Ce sont des bactéries anaérobies pathogènes principalement retrouvées dans le microbiote humain de patients atteints de psoriasis, une maladie inflammatoire cutanée (496). Sa souche principale, *Eggerthella lenta*, a été retrouvée dans les fèces de patients atteints de MICI et est associée à l'activation d'une réponse inflammatoire type Th17 (497, 498). La diminution de la proportion de ces bactéries pourrait donc être protectrice vis-à-vis de l'inflammation induite par l'exposition à ces nanoparticules.



L'ensemble de ces résultats montre que l'inhalation subchronique d'un mélange d'EN induit des modifications de la composition bactérienne intestinale, avec des altérations dépendantes du sexe (diminution du ratio positif *Firmicutes/bacteroidetes* chez le mâle et diminution de certaines bactéries pathogènes retrouvées dans le microbiote de patients atteints de MICI chez les femelles) pouvant jouer un rôle dans l'état micro-inflammatoire observé chez les souris.

Ce constat de la modulation de la composition du microbiote intestinal par des EN inhalées associée au développement d'un état type microinflammatoire, nécessitera d'être étayé et approfondi pour comprendre les mécanismes sous-jacents.

### **b - Exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique simulée :**

L'exposition *in utero* à la pollution atmosphérique ne produit pas chez les souriceaux de modification de l'alpha-diversité (au sein de la diversité de l'échantillon) et de l'indice de richesse spécifique Chao1. Le nombre d'espèces différentes reste donc similaire entre les groupes.

Cependant l'analyse plus approfondie a mis en évidence une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* chez les souriceaux femelles : or ce dernier est caractéristique d'une inflammation de bas grade. Il a été démontré que le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* constitue un marqueur de la maturation intestinale au cours du vieillissement (499). La diminution de ce dernier est indicative d'une altération de la maturation intestinale, l'ensemble de l'homéostasie et de la physiologie intestinale s'en trouve alors modulée. Les *Coriobacteriales* et *Bacteroidales* étaient plus fortement retrouvées chez la femelle. Elles possèdent un rôle dans la régulation de l'homéostasie intestinale et sont dérégulées dans certaines conditions pathologiques. Leur abondance est relativement augmentée dans les modèles murins présentant une colite induite chimiquement par administration de DSS (500, 501), et ont pour fonction d'activer et recruter certaines populations cellulaires immunitaires dans le côlon. Elles permettent ainsi le maintien de la barrière intestinale (502). Ces bactéries sont également plus faiblement retrouvées dans le microbiote de patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique (503, 504).

Une étude exposant des souris pendant 3 semaines à des PM<sub>2,5</sub> concentrées à partir de l'air ambiant Chicago par inhalation a montré une diversité alpha et une diversité beta accrues dans l'intestin grêle, le côlon et les matières fécales. Une diminution de l'abondance relative des *Firmicutes* et de plusieurs familles bactériennes au sein des phyla *Firmicutes*, telles que les *Staphylococcaceae* a été constatée. Cependant, les souris exposées montraient également une augmentation de l'abondance relative des bactéries appartenant au phylum *Bacteroidetes*, y compris les bactéries de la famille des *Rikenellaceae* (281). Ces données montrent le rôle des particules dans les modulations du microbiote. Dans nos travaux, la contribution de celles-ci par rapport à la composante gazeuse ne peut pas être déterminée. Il faudrait pouvoir reproduire cette expérience en ayant un lot de souris uniquement exposées à la phase gazeuse en éliminant la phase particulaire par filtration, par exemple.

## 2 – Une exposition par inhalation à la pollution atmosphérique se traduit par une modulation de l'homéostasie intestinale de manière sexe dépendante

### A - Inhalation des nanoparticules en mélange :

L'originalité de notre étude a été de mettre en évidence une dichotomie de la réponse inflammatoire spécifique au sexe. En effet, dans le côlon distal et proximal, une régulation positive de nombreuses cytokines inflammatoires a été observée chez les mâles, alors que chez les femelles, le schéma inflammatoire a été très légèrement modifié. En outre, un effet tissu spécifique est également observable, puisque dans le jéjunum mâle et femelle, tous les marqueurs inflammatoires ont été trouvés régulés à la baisse chez les souris exposées aux EN (21, 324, 505, 506). De plus la modulation du microbiote intestinal ne s'effectue pas de la même manière chez le mâle et la femelle car ce ne sont pas les mêmes bactéries qui sont impactées. En effet, les *Tenericutes* sont diminuées uniquement chez le mâle. La modulation de la famille des *Eggerthellaceae* est observée chez les deux sexes mais les ordres et classes impactés sont différents en fonction du sexe. Cela pourrait expliquer la différence de modulation dans l'expression des cytokines inflammatoires que l'on observe.

De plus lors d'une exposition aux EN en condition pathologique, une plus grande susceptibilité au développement de la colite, est observée chez les femelles par rapport aux

mâles. En effet, chez les femelles les souris exposées aux EN ont perdu plus de poids du quatrième au dernier jour d'administration de DSS (versus troisième jour chez le mâle), mais le rapport poids/taille du côlon ainsi que le score histologique de colite ont été significativement augmentés uniquement chez les femelles exposées au mélange d'EN.

Les mâles présentaient uniquement une modulation de leur poids d'origine et une augmentation de deux marqueurs inflammatoires.

### **B - Exposition gestationnelle à une pollution atmosphérique simulée :**

Une dichotomie s'observe entre les souriceaux mâles et les souriceaux femelles en fin de sevrage suite à leur exposition *in utero*. En effet, nous observons que les processus de prolifération sont perturbés chez le mâle mais que les marqueurs moléculaires des cellules néonatales ne sont pas modifiés. A contrario, chez la femelle, des modifications des marqueurs cellulaires épithéliaux apparaissent, mais les effets sont moins marqués sur la différenciation et maturation intestinale. Ainsi l'exposition *in utero* durant la formation et la mise en place du tractus digestif semble altérer la bonne maturation et formation du système intestinal et ce de manière spécifique au sexe du souriceau. L'exposition *in utero* à la pollution de l'air de Pékin induit de légères modifications du développement intestinal chez la jeune femelle (surexpression des marqueurs des cellules épithéliales absorbantes Epcam et Car2 et du marqueur cellulaire ChrgA dans l'intestin grêle et diminution de l'expression du marqueur des cellules souches Lgr5 et du marqueur des cellules épithéliales adultes Arg dans le colon) alors que chez le jeune mâle ce sont principalement les paramètres histologiques impliqués dans le développement intestinal qui sont affectés (réduction de la longueur des villosités et de la profondeur de la crypte dans l'intestin grêle, prolifération épithéliale accrue, diminution de la taille et altérations morphologiques des vacuoles) avec cependant une augmentation du marqueur de prolifération PCNA dans l'iléon. En effet, les marqueurs de différenciation et de maturation cellulaire ne sont pas impactés dans l'iléon mais présentent une véritable modulation dans le colon des souriceaux mâles, un effet tissulaire est donc également observé. La jeune femelle, elle ne présente majoritairement que des modulations iliaques de certains de ces marqueurs. L'ensemble de ces résultats tend à confirmer que les effets *in utero* n'induisent donc pas les mêmes altérations intestinales chez le jeune mâle et la jeune femelle.

Ces résultats sont en cohérence avec ceux qui ont démontré qu'une exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique « programme » la descendance à une plus forte prise de poids par une susceptibilité accrue à la prise alimentaire et à une neuroinflammation de manière sexe-dépendante (359).

De même, lors d'une exposition *in utero* aux particules d'échappement de diesel (DEP), des effets sexe-dépendants sur le système immunitaire de la descendance ont été observés (507). Ces anomalies observées dans l'intestin pourraient engendrer et refléter des troubles du développement intestinal méritant d'être étudiés plus amplement.

### 3 – Les effets de l'exposition aux polluants inhalés pourraient être caractérisés grâce à des modèles *in vitro*

Nos travaux chez l'animal ont montré que les polluants inhalés ont des effets intestinaux. La compréhension des mécanismes sous-jacents peut nécessiter des approches *in vitro*. Ces approches sont complémentaires et de plus en plus indispensables dans la compréhension des mécanismes sous-jacents induits par de telles expositions. En outre, dans la réglementation scientifique et notamment dans le cadre de la réglementation éthique de l'utilisation des animaux en recherche, la règle des 3R (Reduce, Replace, Refine) établit une diminution et une revalorisation de l'utilisation des modèles animaux dans les prochaines années. L'utilisation de modèle *in vitro* originaux, précis, et mimant de mieux en mieux la physiologie animale ou humaine est fortement encouragée et considérée comme pertinente. C'est donc dans cet optique que nous avons commencé à explorer, sur des modèles *in vitro*, les effets cellulaires de nos EN, que nous avons testés séparément afin d'évaluer leur cytotoxicité et effet pro-inflammatoire intrinsèque. Pour cela, nous avons utilisé la technique des organoïdes inversés. Nous avons exposé nos organoïdes intestinaux murins à trois concentrations différentes de nanoparticules, basées sur les concentrations définies par Park and ak 2020 (450). Nous souhaitons observer comment les cellules épithéliales se comportent lorsqu'elles sont en contact avec ces polluants. Or, lors d'une exposition par inhalation ou par ingestion les nanoparticules se retrouvent au pôle apical des cellules intestinales (dans la lumière intestinale).

Pour essayer de se rapprocher au mieux de cette situation physiologique, nous avons utilisé le modèle des organoïdes inversés : les organoïdes ont été générés à partir de cryptes intestinales murines, puis ils ont été inversés pour qu'ils puissent présenter le pôle apical vers l'extérieur, vers la lumière intestinale, permettant ainsi d'observer le comportement des cellules constitutives de l'épithélium intestinal (entérocytes, cellules souches, cellules en gobelets, cellules de Paneth, cellules entéroendocrines et cellules mésenchymateuses) lors du contact direct avec la solution de nanoparticules. Cette complexité cellulaire en fait des modèles 3D plus aboutis que ceux établis avec des lignées cellulaires. Les lignées les plus populaires au niveau intestinal sont les lignées Caco-2 et HT-29. Les Caco-2 proviennent d'un adénocarcinome colorectal humain qui ont gardé la capacité se différencier spontanément en un mélange hétérogène de cellules épithéliales intestinales. Elles forment une barrière épithéliale intestinale polarisée quand elles sont cultivées en chambre à deux compartiments (type Transwell). Les cellules HT-29 sont issues d'un cancer du côlon humain qui en culture forment une monocouche serrée et présentent une similitude avec les entérocytes de l'intestin grêle.

Des études *in vitro* ont démontré la capacité de plusieurs types de nanoparticules manufacturées à induire des effets cytotoxiques, inflammatoires, un stress oxydatif ainsi que des réponses génotoxiques dans les cellules exposées. Cependant, les modèles *in vitro* ne peuvent pas être aussi précis et relater la complexité de la réponse *in vivo*. Par conséquent, dans le but d'améliorer la pertinence de la physiologie des modèles *in vitro* et mieux imiter *in vivo* la situation gastro-intestinale, notamment les états d'inflammation, des cultures multicellulaires ont été proposées.

Nous avons évalué le potentiel de chaque EN à perturber la réponse inflammatoire dans les organoïdes intestinaux en étudiant le niveau d'expression des transcrits d'un ensemble de médiateurs inflammatoires. Ti et TiO<sub>2</sub> ont partagé la baisse d'expression de Cxcl1 et l'augmentation de celle d'Il33, les autres cytokines étant modulées de façons différentes. Les EN d'Ag et de Ti avaient une forte capacité à augmenter l'expression de Cxcl10 (10 et 19 fois respectivement à la concentration de 0,2 µM). Dans l'ensemble, TiO<sub>2</sub> était l'EN ayant le moins d'impact sur la réponse inflammatoire intestinale, alors que c'est classiquement la NP pour laquelle les effets délétères sur la santé intestinale sont les plus documentés (508).

Les études réalisées sur des monocultures de Caco-2 et HT-29-MTX-E12 ont montré des effets toxiques plus forts des nanomatériaux d'Ag que le TiO<sub>2</sub> (509). Dans une autre étude *ex vivo*, des tissus intestinaux humains excisés d'individus mâles et femelles ont été exposés à des NP d'Ag qui à 20 µg/mL d'Ag ont induit des altérations sexe-dépendantes de la sécrétion de cytokines (510).

Dans l'ensemble, chacune des 4 EN testées a entraîné une réponse spécifique. Ces premiers résultats sont encourageants pour tester le mélange des EN et explorer davantage les mécanismes mis en jeu en termes de rôle du stress oxydant et de mort cellulaire.

Suite à cela une exploration par différentes techniques d'analyse *in vitro* nous permettra d'établir d'éventuels effets toxiques. En effet, l'utilisation de modèle cellulaire comme les Caco2 exprimant un GFP sensible à l'oxydation localisé dans la mitochondrie, permet de mettre en évidence le fait qu'une exposition aux PMs peut induire une libération de ROS (324). De même l'utilisation de ces modèles cellulaires, caco2 ou HT29 stimulé avec de l'aluminium, pendant 5 jours, permet d'étudier et d'établir une possible cytotoxicité et une altération de la prolifération cellulaire (505).

Ces modèles cellulaires peuvent nous permettre, après les avoir exposés à un cocktail de nanoparticules, d'observer une potentielle toxicité cellulaire, une libération de ROS. Ce sont des analyses essentielles et complémentaires de nos analyses *in vivo*, permettant de mieux comprendre et cibler les mécanismes induits, et également de confirmer les observations établies. Les tests du MTT (méthode rapide de numération des cellules vivantes) et le dosage de la LDH (lactate deshydrogénase) *in vivo* nous permettront d'établir une éventuelle toxicité, l'analyse du stress oxydant par quantification du MDA (malondialdéhyde) et de l'inflammation par la quantification de la MPO (myéloperoxydase) sera également effectuée sur nos organismes murins et à confirmer par des analyses *in vitro*. De même une analyse des effets de ce cocktail de nanoparticules sur un modèle de co-culture de deux types cellulaires, comme les transwells, permettant de mimer au mieux la barrière intestinale pourra nous permettre de confirmer et mieux cibler les impacts potentiels sur la perméabilité intestinale induite par ces NPs.

## Ef

Nous avons mis en évidence des effets extrapulmonaires touchant le TGI suite à une exposition par inhalation aux nanoparticules manufacturées et touchant le placenta/fœtus avec des conséquences au niveau intestinal lors de l'exposition *in utero* suite à une inhalation d'une pollution atmosphérique simulée.

Des effets extrapulmonaires apparaissent suite à une exposition à la fois chez le sujet adulte sain ou présentant une maladie intestinale, pour une exposition à un cocktail de nanoparticules manufacturées, mais également et chez les souriceaux dont les mères ont été exposées à une pollution atmosphérique complexe durant la gestation.

### L'axe poumon-intestin et l'inhalation d'un cocktail d'EN

Le TGI est une cible pertinente pour les effets extrapulmonaires des ENM inhalées et c'est ce que nous avons démontré dans notre étude, puisqu'une microinflammation et l'aggravation d'une inflammation intestinale sont induites chez le mâle sain et chez le mâle et la femelle présentant une colite, respectivement.

Comment les EN inhalées peuvent-elles impacter l'homéostasie intestinale ? Cela peut passer par des mécanismes directs liés à la capacité des EN d'interagir directement avec les cellules intestinales parce qu'elles franchissent la barrière alvéolo-capillaire et atteignent l'intestin par la voie systémique et/ou parce que le mécanisme de clairance muco-ciliaire conduit à l'épuration des EN inhalées vers le TGI. Dans les deux cas les EN peuvent entrer en contact avec les cellules, soit par la voie systémique en cas de translocation au niveau de la barrière air-sang soit au niveau de la lumière intestinale dans le cas de la clairance. Les effets sur l'homéostasie intestinale peuvent aussi résulter de mécanismes indirects liés à la réaction du poumon suite à la présence des EN qui peut se traduire par la libération de médiateurs toxiques qui diffuseront jusqu'à l'intestin par la voie systémique.

Plusieurs études de biodistribution ont été réalisées par le groupe de Wolfgang Kreyling en utilisant des EN radiomarquées. Il montre que la translocation des EN inhalées vers la circulation systémique est dépendante de la taille des EN mais reste faible avec une concentration inférieure à 0,5 % de la concentration initiale (342, 511-513). Néanmoins, en cas d'exposition chronique, l'accumulation des nanoparticules dans les organes cibles peut atteindre un seuil critique causant des dommages.

Parmi les effets extrapulmonaires, ceux sur le tube digestif ne sont pas encore très bien explorés. Les nanoparticules inhalées peuvent atteindre le tube digestif à de forte quantité comme dans d'autres organes (512, 513). Le TGI peut être exposé à des nanoparticules qui ont traversé la barrière alvéolaire et qui vont atteindre la circulation systémique. C'est notamment ce qui est suggéré par l'excrétion fécale de nanoparticules manufacturées suite à une injection intraveineuse (514). La quantité de ces nanoparticules atteignant l'intestin à travers la circulation systémique est probablement supérieure à celle retrouvée dans les autres sites.

C'est notamment ce que montre Lee et al. : les nanoparticules manufacturées d'argent ont été transférées de la circulation systémique vers l'intestin et ont également été retrouvées dans le foie, dans le rein ou d'autres sites biologiques (515).

Parallèlement au passage de la barrière alvéolo-capillaire, le TGI peut également être exposé aux nanoparticules inhalées et éliminées des poumons par la clairance muco-ciliaire qui est une voie d'élimination majeure par rapport à la translocation à travers la barrière alvéolo-capillaire (516) mais aussi aux nanoparticules directement ingérées via notre respiration (« aérophagie »). Les personnes touchées par ce désordre physiologique ingèrent de l'air (et son contenu) de manière plus forte que la normale. La pertinence de l'exposition gastro-intestinale après l'inhalation aux EN est fortement soutenue par des observations récentes. En effet, chez des rats exposés par inhalation au  $\text{CeO}_2$ , la plus grande quantité de ces EN est retrouvée dans les fèces (71-90%) alors que dans les poumons il n'y a que 7-18%, et les 4 et 6% qui restent se répartissent entre les urines et autres organes extra-pulmonaires, un jour après l'exposition (517). La présence des EN dans les selles est la preuve d'une interaction significative avec le TGI et son microbiote.

Enfin, il est maintenant admis que l'intestin est sensible aux médiateurs libérés par le poumon enflammé, c'est ce qu'on appelle l'axe poumon-intestin. Un médiateur potentiel pourrait être l'interleukine-6 (IL-6), qui est systématiquement élevée chez les patients souffrant d'emphysème (518) et est impliquée dans la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin (519). Lors de notre étude, d'autres organes comme le rein, le foie, la rate, les poumons, le bulbe olfactif, l'hippocampe, ont été prélevés. L'analyse de leur réaction inflammatoire suite à l'exposition par inhalation au mélange d'EN n'a pas induit de résultats probants et ne sont donc pas illustrés dans ce manuscrit.



La poursuite de l'analyse et de la caractérisation des effets pulmonaires et extrapulmonaires pourra apporter d'autres éclairages sur d'autres médiateurs potentiels.

Nos études nous permettent de confirmer l'existence et l'impact de cet axe poumon-intestin sur l'altération de l'homéostasie intestinale par les particules inhalées. Rappelons que l'axe poumon-intestin est basé sur un échange bidirectionnel entre le microbiote et le système immunitaire de l'intestin et des poumons (520). Il serait intéressant d'étudier davantage cet échange par une analyse de la flore microbienne pulmonaire. Elle permettrait d'observer si suite à une exposition pulmonaire altérant la composition du microbiote intestinal, une altération plus tardive de celui de l'arbre respiratoire pourrait apparaître et donc induire/entraîner l'apparition et le développement de maladies respiratoires, voir d'autres dysfonctionnements physiologiques. L'étude de la présence des AGCC (le butyrate par exemple) pourrait être considérée et permettrait d'établir un possible mécanisme causal de ces modifications homéostatiques. Des études avec des particules PM<sub>2,5</sub> ont montré que non seulement elles endommagent les cellules épithéliales des voies respiratoires mais aussi qu'elles détruisent sélectivement certains microorganismes pulmonaires (406, 521). Les bactéries pathogènes et leurs toxines peuvent alors migrer vers le sang puis jusqu'aux organes et tissus y compris les intestins (522). La flore intestinale s'en trouve alors altérée, la barrière intestinale présentant des dysfonctionnements (modulation de sa perméabilité), une réponse immunitaire s'établit alors (391, 523).

Ce qui nous semble important de citer est la nouveauté de l'utilisation de ce type d'exposition pour l'étude de pathologies intestinales. L'importance de l'axe poumon-intestin apparaît ici et se confirme. Comme indiqué en introduction, chez un individu sain, le microbiote des voies respiratoires et celui du tractus gastro-intestinal sont constitués d'éléments distinctifs (archées, eucaryotes, virus, bactéries et champignons) vivant en symbiose afin de permettre l'homéostasie tissulaire (524). De plus, les pathologies respiratoires induites par la pollution de l'air, favorisent une dysbiose du microbiote pulmonaire et intestinal. Cette dysbiose observe une excroissance de *Proteobacteria* et *Firmicutes* (392). Nos études présentent également ce type d'effets dans les microbiotes intestinaux des différentes souris analysées (exposition *in utero* à une pollution atmosphérique complexe ou exposition à l'âge adulte à un cocktail de nanoparticules).

La perturbation de protéines impliquées dans les jonctions serrées, éléments essentiels au maintien de la perméabilité intestinale, en réponse à des agents environnementaux possède un impact direct sur les bactéries intestinales commensales et le système immunitaire pulmonaire (525). Une augmentation de la perméabilité intestinale permet la migration systémique de ces bactéries et de leurs métabolites (acides gras à chaîne courte ; AGCC) dans l'organisme et notamment vers les poumons (391, 526, 527). Dans des conditions inflammatoires, les cellules souches hématopoïétiques peuvent se différencier et donner naissance à des précurseurs de cellules dendritiques se diffusant dans les poumons et mûrissant en cellules dendritiques spécifiques (527-529). Les AGCC peuvent également affecter l'immunité pulmonaire en améliorant l'activité des lymphocytes cytotoxiques T CD8 (530), favorisant l'expression du facteur de transcription FOXP3 et régulant la production de pro-inflammatoires cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10) (531-533).

L'ensemble de ces arguments confirment nos premiers résultats établis suite à nos deux études étudiant l'impact des effets d'une exposition par inhalation à deux types de pollution environnementale. Ils confirment également l'intérêt et la pertinence de nos études ainsi que la nécessité de poursuivre ces expérimentations.

### **Les effets extrapulmonaires chez le fœtus après une exposition *in utero* à une atmosphère simulée**

Les modulations intestinales retrouvées dans la descendance peuvent être induites par des modifications épigénétiques, prédisposant alors l'individu à développer une dysbiose, pouvant être causée par des effets épigénétiques induit lors d'une exposition intra-utérine à différents polluants. La sensibilité de la progéniture aux maladies inflammatoires intestinales est donc exacerbée et peut expliquer leur survenue dans le courant de la vie.

L'épigénétique est l'étude des altérations de la fonction des gènes sans modification de la séquence d'ADN. Cette analyse permet d'étudier des mécanismes biologiques par lesquels la pollution de l'air peut impacter la physiologie. Elles sont de différentes sortes : méthylations CpG, modifications d'histones et ARN non codants modulant et affectant la transcription de gènes et augmentant ainsi le risque de survenue de maladies (534).

Des altérations épigénétiques ont été associées dans l'implication de nombreuses maladies (535-538), et de cancer (539, 540).

Il semble que l'exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique induit des modifications épigénétiques du placenta et du sang de cordon. Les particules ambiantes provoquent des changements épigénomiques importants, comme des altérations de la méthylation de l'ADN, de la régulation des miRNA et des modifications des histones. Les micro-ARN sont une catégorie de petits acides ribonucléiques, simple brin, non codants et propres aux cellules eucaryotes. L'altération de l'expression placentaire de certain miRNA ainsi qu'une modification de certaines histones du cordon ont été observées suite à une exposition gestationnelle à des PM<sub>2,5</sub>, confortant l'idée de l'existence d'une fenêtre d'exposition (541).. Une exposition des mères durant le dernier trimestre de la grossesse aux PM<sub>2,5</sub> induit une méthylation des gènes placentaires impliqués dans la réparation de l'ADN (542).

Une exposition aux PM<sub>10</sub> durant les deux premiers trimestres de la grossesse entraîne une méthylation placentaire de gènes impliqués dans la croissance fœtale. Cette méthylation régule et module ainsi leurs expressions impactant leurs traductions phénotypiques expliquant les faibles poids des nourrissons retrouvés à la naissance.

La survenue des MICI peut être associée à des modifications/altérations génétiques dues à une exposition à des facteurs de risque environnementaux à différents moments de la vie. L'exposition prénatale à des facteurs environnementaux impacte le développement des MICI, justifiant ainsi notre deuxième étude. L'exposition *intra-utérine* (prénatalité) est une période critique de développement et de prédisposition aux MICI (543-545). L'environnement peut avoir des effets et induire des mutations mortelles, des mutations viables ou des polymorphismes, ainsi que de nouveaux réarrangements génomiques. Les influences alimentaires maternelles pendant le développement gestationnel peuvent induire des changements épigénétiques chez la progéniture des mammifères, conduisant potentiellement à une susceptibilité à la colite (546-549). Il est connu que les SNP (les polymorphismes d'un seul nucléotidiques) associés aux risques de développer une MICI n'expliquent qu'une partie de leur héritabilité (550), et ne peuvent pas expliquer l'incidence croissante de leurs prévalence (551).

L'établissement d'un profil épigénétique de l'intestin fœtal humain ainsi que les études sur des organoïdes intestinaux, ont révélé des changements épigénétiques et transcriptomiques majeurs (549). La reprogrammation épigénétique fœtale peut être modifiée, perturbée par certains facteurs environnementaux. Seules quelques études sur des modèles animaux ont étudiés l'impact de tels facteurs environnementaux pouvant influencer la susceptibilité de développer des MICI chez la descendance. Ces études ont montré qu'une exposition prénatale sur des modèles animaux présentant une colite expérimentalement induite, augmente la susceptibilité de développer une colite chez la progéniture (552).

Etudier les effets épigénétiques induit par nos différentes pollutions semblerait donc une perspective intéressante pour compléter nos travaux et comprendre les différentes modulations et modifications induites et responsables de cette inflammation intestinale.



# PARTIE IV - CONCLUSION

Les objectifs de cette thèse étaient d'étudier et d'identifier l'impact de différents types de pollution sur le système immunitaire intestinal. Nous souhaitions observer si une exposition par inhalation à la pollution atmosphérique, induisait dans un premier temps des modulations de l'homéostasie intestinale, et dans un second temps, modulait la réponse inflammatoire potentiellement induite.

L'établissement d'un état de micro-inflammation a été observé et uniquement retrouvé chez le mâle, suite à une exposition à un cocktail de nanoparticules manufacturées les plus fréquemment présentes dans l'environnement. Un effet sex-dépendant d'une telle exposition semble donc exister et se dessiner. En outre, cette exposition module également la composition du microbiote intestinal de nos souris. De la même façon, cette modulation apparaît de manière sex-dépendante mais également de manière tissu-dépendante. De telles observations méritent de plus amples investigations afin de comprendre et d'établir les potentiels mécanismes inflammatoires et de stress oxydant induits. Les effets d'une exposition à ce type de polluant ont également montré une aggravation d'un état pathologique intestinal initialement présent. En effet, les individus présentant une colite induite expérimentalement, montrent une aggravation de cette dernière. Le profil inflammatoire établi et induit reste à conforter et à identifier.

Enfin, une exposition à une pollution atmosphérique complexe, durant la gestation, induit de réelles altérations au sein du système intestinal du souriceau. Le petit souriceau, à l'âge du sevrage, présente à la fois des altérations histologiques et anatomiques de son tractus digestif, ainsi qu'une modulation de sa réponse immunitaire et de la constitution de son microbiote intestinal. Un effet sexe est également observé.

Il serait intéressant de compléter notre étude par des études *in vivo* pouvant fournir des biomarqueurs possibles de l'exposition et de l'effet précoce d'une telle exposition à ces EN. La clairance mucociliaire suivie de l'excrétion fécale représente une voie pour éliminer les NP inhalées (241, 553). Bien qu'il soit assez difficile d'utiliser régulièrement des matières fécales comme matrice biologique dans la surveillance professionnelle, celle-ci reste particulièrement facile d'accès chez l'humain et ne présente aucune invasion biologique pour sa récupération. Lors d'une exposition à une NP ou à un cocktail de nanoparticules, la mesure de la teneur en métal élémentaire dans les matières fécales doit être considérée comme un moyen d'évaluer les expositions réelles à ce type de NP (553).

De plus, l'identification de biomarqueurs des effets précoces, notamment des inflammations et altérations des muqueuses, détectables dans la matrice fécale seraient une possible perspective dans la prévention des effets des différents polluants atmosphériques. Comparer les différents éléments moléculaires ou protéiques entre ces matrices fécales et celles réalisées sur un patient atteint de la maladie de Chron ou d'une rectocolite hémorragique, pourrait fournir des indications potentielles pour ces futures études (554).

L'analyse de l'expression différentielle de ces gènes et protéines effectuée permettra d'identifier des profils moléculaires indicatifs d'une exposition à une pollution atmosphérique spécifique. Cela peut, également, être utile pour comprendre les processus biologiques altérés suite à ce type d'exposition par inhalation ou éventuellement impliqués dans la toxicologie de ces polluants. Etablir et identifier ces conditions de susceptibilité aux effets indésirables des polluants atmosphériques, ces différences intra et interindividuelles dans la physiologie saine et pathologique permettra d'anticiper les effets d'une telle exposition. En effet, cette variabilité intra et inter individuelle peut altérer l'environnement du tractus gastro-intestinal, affectant la stabilité des particules ou nanoparticules inhalées, ainsi que la perméabilité épithéliale.

Des études sur l'impact d'une exposition aux EN et ses conséquences pathologiques sur le microbiote doivent être envisagées. Des échantillons fécaux comme modèles représentatifs du microbiote du côlon, ainsi que des échantillons de microbiote de l'intestin grêle humain obtenu à partir de biopsies des personnes subissant une chirurgie du côlon, peuvent être utilisées. L'emploi de modèles « humanisés » par l'inoculation du microbiote intestinal humain sur des animaux gnotobiotiques peut être un modèle idéal pour étudier les effets *in vivo* de mélange de nanoparticules ou de pollution plus complexe. L'étude des interactions entre notre polluant et le tractus gastro-intestinal peut permettre d'identifier des biomarqueurs associés aux altérations induites sur le microbiote intestinal.

Une analyse des différentes populations cellulaires immunitaires présentes au sein des différents segments du TGI serait également intéressante. Elle nous permettrait d'établir les différentes populations immunitaires impliquées dans la réponse induite par ces expositions, pouvant potentiellement expliquer la différence retrouvée entre l'iléon et le colon. Une analyse par cytométrie en flux FACS (fluorescence activated cell) permettra de quantifier les



populations cellulaires (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques) ainsi que leurs sous-populations (activées ou non, ...) et d'établir quelles sont les populations majoritairement présentes. De même, une caractérisation des réponses inflammatoires observées chez nos souriceaux, et une quantification du nombre de mastocytes et d'éosinophiles dans ces tissus, ainsi que d'autres marqueurs de la réponse allergique pourrait être envisageable par la suite. Cette perspective nous permettrait de mieux comprendre le mécanisme d'action et d'induction de la réponse inflammatoire observée chez les jeunes souriceaux non sevrés, afin de comparer celles potentiellement retrouvée après sevrage.

Ces travaux s'inscrivent donc dans un cadre plus large de réglementation sanitaire. La pollution de l'air étant un fléau de Santé Publique mondiale, il est dans l'intérêt scientifique et celui de la population, de pouvoir définir les différents mécanismes et voies de signalisation impliquées dans la survenue de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, afin de pouvoir par la suite extrapoler et confronter nos résultats aux données épidémiologiques et cliniques.

Les préoccupations sanitaires et de santé montrent qu'il devient de plus en plus urgent d'établir les liens de corrélation et de causalité associés entre la prédisposition ou la susceptibilité à développer des MICI et l'exposition à la pollution atmosphérique par inhalation. Dans un monde ultra industrialisé, ultramodernisé, en constant changement et présentant une population mondiale de plus en plus importante, des populations vulnérables apparaissent. L'apparition de ces dernières apporte de nouvelles interrogations sur leurs protections et sur la prise en charge des pathologies causées par une exposition à cette pollution atmosphérique.

Cette thèse présente un premier travail sur les effets potentiellement observés suite à une exposition atmosphérique à la pollution de l'air.

Elle reste très succincte vis-à-vis du fléau que représente la pollution de l'air et ses impacts tant au niveau scientifique, sanitaire, politique, social, éthique, environnemental, etc.





Cécile Vignal, Eva Guilloteau, Corinne Gower-Rousseau, Mathilde Body-Malapel

**Review article : Epidemiological and animal evidence for the role of air pollution in intestinal diseases**

Science of the total environment, Volume 757, 25 février 2021, 143718

Eva Guilloteau, Madjid Djouina, Ségolène Caboche, Christophe Waxin, Karine Deboudt, Delphine Beury, David Hot, Muriel Pichavant, Cécile Vignal, Marie Choël, Mathilde Body-Malapel

**Exposure to atmospheric Ag, TiO<sub>2</sub>, Ti and SiO<sub>2</sub> engineered nanoparticles modulates inflammatory response and gut microbiota in mice**

Ecotoxicology and Environmental Safety - 2022 - accepted in with minor corrections

Eva Guilloteau, Patrice Coll, Zhuyi Lu, Madjid Djouina, Mathieu Cazaunau, Christophe Waxin, Antonin Berge, Ségolène Caboche, Aline Gratien, David Hot, Laurent Dubuquoy, David Launay, Cécile Vignal, Sophie Lanone, Mathilde Body-Malapel

**In utero exposure to simulated complex urban air pollution disturbs intestinal suckling-to-weaning transition in mice**

Particle and Fibre Toxicology - 2022 - accepted in with minor corrections



ARTICLE IN PRESS

STOTEN-143718; No of Pages 12

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Review

Review article: Epidemiological and animal evidence for the role of air pollution in intestinal diseases

Cécile Vignal <sup>a</sup>, Eva Guilloteau <sup>a</sup>, Corinne Gower-Rousseau <sup>a,b</sup>, Mathilde Body-Malapel <sup>a,\*</sup>

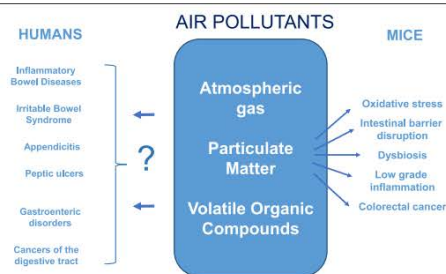
<sup>a</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286- INFINITE - Institute for translational research in inflammation, F-59000 Lille, France

<sup>b</sup> Epidemiology Unit, Epimad Registry, Lille University Hospital, France

HIGHLIGHTS

- Epidemiological studies revealed associations between air pollutants and hospitalizations for several intestinal disorders.
- Exposure to SO<sub>2</sub>, and to a lesser extent to NO<sub>2</sub> and CO, could increase the risk of various intestinal diseases.
- Exposure of mice to particulate matter causes disturbance of intestinal oxidative stress, permeability, and microbiota.
- Numerous epidemiological and animal research gaps on the effects of air pollution in intestinal health remain to be filled.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

**Article history:**  
 Received 30 July 2020  
 Received in revised form 9 November 2020  
 Accepted 9 November 2020  
 Available online xxx

Editor: Philip K. Hopke

**Keywords:**  
 Air pollution  
 Intestinal diseases  
 Particulate matter  
 Colitis  
 Dysbiosis

ABSTRACT

**Background:** Ambient air pollution is recognized as one of the leading causes of global burden of disease. Involvement of air pollution in respiratory and cardiovascular diseases was first recognized, and then cumulative data has indicated that the intestinal tract could be also damaged.  
**Aim:** To review and discuss the current epidemiological and animal data on the effects of air pollution on intestinal homeostasis.  
**Methods:** An extensive literature search was conducted using Google Scholar and Pubmed to gather relevant human and animal studies that have reported the effects of any air pollutant on the intestine.  
**Results:** Exposure to several gaseous and particulate matter components of air pollution have been associated either positively or negatively with the onset of various intestinal diseases including appendicitis, gastroenteric disorders, irritable bowel syndrome, inflammatory bowel diseases, and peptic ulcers. Several atmospheric pollutants have been associated with modifications of gut microbiota in humans. Animal studies have showed that inhalation of atmospheric particulate matter can lead to modifications of gut microbiota, impairments of oxidative and inflammatory intestinal balances, and disruption of gut epithelial permeability.  
**Conclusions:** Overall, the literature appears to indicate that the gut is an underestimated target of adverse health effects induced by air pollution. It is therefore important to develop additional studies that aim to better understand the link between air pollutants and gastro-intestinal diseases.

© 2020 Published by Elsevier B.V.

\* Corresponding author at: Institute for Translational Research in Inflammation, Infinite - Univ. Lille, Inserm, CHU Lille U1286, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 4ème étage Centre, Place Verdun, F-59045 Lille Cedex, France.  
 E-mail address: mathilde.body@univ-lille.fr (M. Body-Malapel).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143718>  
 0048-9697/© 2020 Published by Elsevier B.V.

Please cite this article as: C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau, et al., Review article: Epidemiological and animal evidence for the role of air pollution in intestinal dise..., Science of the Total Environment, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143718>

ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

Contents

1. Introduction . . . . . 0

2. Epidemiological evidence for the effects of air pollution on intestinal health . . . . . 0

    2.1. Effects of global markers of air pollution on intestinal health . . . . . 0

    2.2. Effects of PM on intestinal health . . . . . 0

    2.3. Effects of atmospheric gas on intestinal health . . . . . 0

        2.3.1. NO<sub>2</sub> . . . . . 0

        2.3.2. SO<sub>2</sub> . . . . . 0

        2.3.3. O<sub>3</sub> . . . . . 0

        2.3.4. CO . . . . . 0

    2.4. Effects of VOCs on intestinal health . . . . . 0

3. Effects of air pollutants on intestinal microbiota in humans . . . . . 0

4. Evidence of air pollution effects on intestinal health in animals . . . . . 0

5. Conclusions . . . . . 0

CRedit authorship contribution statement . . . . . 0

Declaration of competing interest . . . . . 0

Acknowledgments . . . . . 0

References . . . . . 0

1. Introduction

The World Health Organization has identified air pollution as the single largest environmental health risk of the 21st century (WHO, 2020). Global excess mortality from all ambient air pollution is estimated at 8.8 (7.11–10.41) million deaths per year, with a loss of life expectancy of 2.9 (2.3–3.5) years, a factor exceeding that of tobacco smoking (Lelieveld et al., 2020). Geographically, the mortality from air pollution is dominated by East Asia (35%) and South Asia (32%), followed by Africa (11%) and Europe (9%). The corresponding fractions for the years of life lost are 29%, 36%, 17%, and 6%, respectively.

Air pollution is a complex mixture of solid and liquid particles suspended in the air as well as gaseous components. Particulate matter (PM) is an element of air pollution that has the most documented adverse health effects. PM primarily comprises of solid particles derived from the combustion of coal, gasoline, and diesel fuels (Alemayehu et al., 2020). PM is usually classified according to size (e.g. PM<sub>10</sub> or coarse PM has an aerodynamic diameter of ≤10µm; PM<sub>2.5</sub> of ≤2.5 µm; and ultrafine PM (UFP) of ≤0.1 µm), but PM is also designated according to its source (e.g. diesel exhaust particles (DEPs) or black carbon). The major components of PM are pollen, sulfates, nitrates, organic carbon, mineral dust, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), metals, ions, and biological components (e.g. microbial particles, lipopolysaccharide, and spores) (Vincent et al., 1997). Other components of air pollution are gaseous pollutants (e.g. nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>), carbon monoxide (CO), sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>), and ozone (O<sub>3</sub>)) and volatile organic compounds (VOCs). Sources of air pollutants are various, therefore air pollutants can vary substantially in chemical composition between different locations. Estimations show that approximately 25% of urban ambient air pollution from PM<sub>2.5</sub> is contributed by traffic, 15% by industrial activities including electricity generation, 20% by domestic fuel burning, 22% from unspecified sources of human origin, and 18% from natural sources (Karagulian et al., 2015). Indoor atmospheric pollution is a mix of outdoor pollutants prevalently associated with vehicular traffic and industrial activities, which can enter by infiltrations and/or through natural and mechanical ventilation systems, as well as contaminants which originate inside the building (Cincinelli and Martellini, 2017). Common indoor pollution sources include building materials and furnishings (e.g. paints and wood preservatives), and activities of combustion (e.g. fireplaces, candles, and cigarette smoking), cleaning chemicals, and cooking (Cincinelli and Martellini, 2017).

Global excess mortality from all ambient air pollution is primarily due to pulmonary and cardiovascular diseases (lower respiratory tract infections, chronic obstructive pulmonary diseases, lung cancers, cerebrovascular diseases, and ischemic heart diseases) (Lelieveld et al.,

2020). Air pollution also increases the burden of other non-communicable diseases (Lelieveld et al., 2020; Schraufnagel et al., 2019). Notably, over the past decade, a growing body of research has suggested a causal relationship between ambient air pollution exposure and gastrointestinal disorders.

This systematic review attempts to bring together current information on the relationship between air pollution and intestinal disturbances. Our search did not find data on the association between indoor air pollution and intestinal diseases. Studies on liver and metabolism were excluded. Firstly, epidemiological studies are presented which assess the link between air pollutants and adverse intestinal manifestations: this review summarizes studies mainly focused on inflammatory bowel diseases (IBDs), Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), cancers of the digestive tract, irritable bowel syndrome (IBS) and non-specific abdominal pain, enteritis, appendicitis, and peptic ulcer. Secondly, studies which examine how air pollution exposure impacts the human microbiota are described. Lastly, we present current data regarding the relationship between air pollution and intestinal diseases in animals. In this review, we have focused on studies with exposure by inhalation, which represents the most physiological way of modelling real-world exposure to atmospheric pollutants.

2. Epidemiological evidence for the effects of air pollution on intestinal health

Associations between various intestinal diseases and air pollution have been assessed in retrospective studies, which are presented on the basis of individual pollutants. The confounders for which the odds ratio were adjusted for in the regression analyses are listed in Supplementary Table 1.

2.1. Effects of global markers of air pollution on intestinal health

Few epidemiological studies have demonstrated a link between intestinal diseases and global markers of air pollution (Table 1). Opstelten et al. investigated the association between residential exposure to ambient air pollution and IBD in a nested case-control study within a multicenter European cohort. A positive association was found between IBD and total traffic load on all major roads (Opstelten et al., 2016). To address the association between prenatal exposures of air pollution and IBD incidence, Elten et al. conducted a large population-based retrospective cohort study. They considered the redox-weighted oxidant capacity, a measure which takes into account the oxidative potential of both NO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>, and they found increased associations with pediatric-onset IBD for exposure during the second trimester of



ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

**Table 1**  
Overview of studies on the effects of global markers of air pollution on human intestinal health.

Reference	Pollutant	Condition with which there is association	Exposure window	Exposure duration	Reported effects
Opstelten JL, et al. Dig. Dis. Sci. 2016	Traffic intensity on major roads within 100 m buffer	IBD	Adult	Pollution parameters measured within 1 year during three different seasons between 2008 and 2011	Positive association OR 1.60, 95% CI 1.06–2.43 per 4,000,000 motor vehicles × m per day
Elten M, et al. Environ. Int. 2020	Redox-weighted oxidant capacity	IBD	Pediatric-onset IBD diagnosis	Second trimester Childhood	Positive association HR 1.21, 95% CI 1.03–1.42 Positive association HR 1.08, 95% CI 1.01–1.16
Ananthakrishnan AN, et al. Inflamm. Bowel Dis. 2011	Total criteria pollutant emission (CO, NO, SO <sub>2</sub> , VOC, PM <sub>2.5</sub> )	IBD	Adult	Trimester 1/Trimester 3/Pregnancy Average annual emissions density	No association Positive association Incidence rate ratio 1.40, 95% CI 1.31–1.50, <i>p</i> < 0.001
Cong X, et al. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2018	Waste gas emission	Small intestinal cancer	Adult	Emissions from 1983 to 2010	Positive association OR = 1.802, 95% CI 0.052–0.163 <i>p</i> < 0.001
		Colorectal cancer	Adult	Emissions from 1983 to 2010	Positive association OR = 2.024, 95% CI 1.39–2.52 <i>p</i> < 0.001
		Anal cancer	Adult	Emissions from 1983 to 2010	Positive association OR = 2.071, 95% CI 0.88–2.08 <i>p</i> < 0.001
		Esophageal cancer	Adult	Emissions from 1983 to 2010	Negative association OR = 0.850 95% CI –0.44–0.21 <i>p</i> < 0.05

The beta values have been changed to OR using  $OR = \exp(\beta)$  for better understanding. CI, confidence interval; CO, carbon monoxide; HR, hazard ratio; IBD, inflammatory bowel disease; NO<sub>2</sub>, nitrogen dioxide; OR, odds ratio; PM<sub>2.5</sub>, particulate matter ≤2.5 µm; SO<sub>2</sub>, sulfur dioxide; VOC, volatile organic compound.

pregnancy and childhood (Elten et al., 2020). Total criteria pollutant emission (CO, NO, SO<sub>2</sub>, VOCs, and PM<sub>2.5</sub>) were associated with increased hospitalizations for IBD (Ananthakrishnan et al., 2011). Moreover, Cong et al. have conducted a retrospective population-based study in China seeking to investigate effects of outdoor air pollution from waste gas emission on multiple cancer incidences (Cong, 2018). They showed that waste gas emissions were significantly positively associated with incidence of small intestinal, colorectal, and anal cancers (all *p* < 0.05). A negative association was also observed between waste gas emissions and esophagus cancer incidence (*p* < 0.05).

2.2. Effects of PM on intestinal health

Few epidemiological studies have investigated the association between PM and intestinal clinical manifestations (Table 2). In a European nested case-control study by Opstelten et al., exposure to fine PM was inversely associated with risk of IBD in adulthood (Opstelten et al., 2016). In a population-based cohort study by Elten et al., maternal or early-life exposure to PM<sub>2.5</sub> was not associated with

pediatric-onset IBD diagnosis (Elten et al., 2020). Effects of PM<sub>2.5</sub> exposure on IBD development could therefore be dependent on age of exposure. Other studies have shown that higher atmospheric levels of PM<sub>2.5</sub> increased the risk of hospitalizations for various digestive tract ailments, namely IBD (Ananthakrishnan et al., 2011), non-specific abdominal pain (Kaplan et al., 2012), enteritis (Xu et al., 2016), appendicitis (on warm days only) (Chen and Yang, 2018), and peptic ulcer (Tsai et al., 2019). Finally, a recent study identified associations between air pollution exposure and hospital admissions for several diseases of the digestive system (Gu et al., 2020). Globally, a 10 µg/m<sup>3</sup> increase in PM<sub>2.5</sub> was associated with a significant increase in hospital admissions for diseases of the digestive system on the same day in both single- and two-pollutant models (adjusting for ozone). Moreover, in both of these models, the same-day concentration of PM<sub>2.5</sub> (lag 0 days) was significantly and positively associated with hospital admissions for 7 categories of digestive diseases, including intestinal infection, esophageal disorders, gastritis and duodenitis, appendiceal conditions, gastrointestinal hemorrhage, noninfectious gastroenteritis (and liver diseases).

**Table 2**  
Overview of studies on the effects of PM<sub>2.5</sub> on human intestinal health.

Reference	Condition with which there is association	Exposure window	Exposure duration	Reported effects
Opstelten JL, et al. Dig. Dis. Sci. 2016	IBD development	Adult	Pollution parameters measured within 1 year during three different seasons between 2008 and 2011	Negative association OR 0.28, 95% CI 0.08–0.94 per 5 µg/m <sup>3</sup> ( <i>p</i> <sub>trend</sub> = 0.01)
Elten M, et al. Environ. Int. 2020	IBD development	<18 years	Trimester 1 Trimester 2 Trimester 3 Pregnancy Childhood	No association
Ananthakrishnan AN, et al. Inflamm. Bowel Dis. 2011	Hospitalization for IBD	Adult	Average annual emissions density	Positive association Incidence rate ratio 1.25, 95% CI: 1.18–1.33, <i>p</i> < 0.001

(continued on next page)



ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

Table 2 (continued)

Reference	Condition with which there is association	Exposure window	Exposure duration	Reported effects
Kaplan GG, et al. PLoS One 2012	Hospitalization for non-specific abdominal pain	15–24 years	Same day air pollutant concentration	Positive association Edmonton: OR 1.03, 95% CI 1.00–1.05 Montreal: OR 1.09, 95% CI 1.04–1.15
Xu C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2016	Hospitalization for enteritis	Adult	10 µg/m <sup>3</sup> increase on the concurrent days	Positive association Percent change 0.89 95% CI 0.25–1.53, <i>p</i> < 0.05
Chen C—C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2018	Hospitalization for appendicitis	Adult	Interquartile range increase 16.10 µg/m <sup>3</sup>	Positive association Warm days ≥23 °C OR 1.10 95% CI 1.05–1.15, <i>p</i> < 0.05
Tsai S—S et al. Int. J. Environ. Res. Public. Health 2019	Hospitalization for peptic ulcers	Adult	2009–2013 ambient air pollutant exposure	Whole period: OR 1.00, 95% CI 0.98–1.03, ns Warm days (>23° C): OR 1.14, 95% CI 1.09–1.18, <i>p</i> < 0.05 Cold days (<23 °C): OR 1.01, 95% CI 0.98–1.04, ns
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for diseases of the digestive system	Adult	Single-day exposure of the same day	Positive association Percent change of hospitalization per 10 µg/m <sup>3</sup> increase in PM <sub>2.5</sub> Single-pollutant model 0.19 (0.13,0.24) <i>p</i> < 0.001 Two-pollutant model 0.21 (0.15, 0.27) <i>p</i> < 0.001
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for intestinal infection	Adult	Single-day exposure of the same day	Positive association Percent change of hospitalization per 10 µg/m <sup>3</sup> increase in PM <sub>2.5</sub> Single-pollutant model 0.76 (0.40,1.12) <i>p</i> < 0.001 Two-pollutant model 0.97 (0.59, 1.35) <i>p</i> < 0.001
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for esophageal disorders	Adult	Single-day exposure of the same day	Positive association Percent change of hospitalization per 10 µg/m <sup>3</sup> increase in PM <sub>2.5</sub> Single-pollutant model 0.34 (0.10,0.59) <i>p</i> = 0.031 Two-pollutant model 0.39 (0.11, 0.67) <i>p</i> = 0.038
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for gastritis and duodenitis	Adult	Single-day exposure of the same day	Positive association Percent change of hospitalization per 10 µg/m <sup>3</sup> increase in PM <sub>2.5</sub> Single-pollutant model 0.24 (0.08,0.40) <i>p</i> = 0.018 Two-pollutant model 0.24 (0.06, 0.42) <i>p</i> = 0.049
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for appendicitis and other appendiceal conditions	Adult	Single-day exposure of the same day	Positive association Percent change of hospitalization per 10 µg/m <sup>3</sup> increase in PM <sub>2.5</sub> Single-pollutant model 0.26 (0.12,0.41) <i>p</i> = 0.003 Two-pollutant model 0.25 (0.08, 0.42) <i>p</i> = 0.024
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for gastrointestinal hemorrhage	Adult	Single-day exposure of the same day	Positive association Percent change of hospitalization per 10 µg/m <sup>3</sup> increase in PM <sub>2.5</sub> Single-pollutant model 0.30 (0.14,0.46) <i>p</i> = 0.002 Two-pollutant model 0.34 (0.14, 0.53) <i>p</i> = 0.007
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for noninfectious gastroenteritis	Adult	Single-day exposure of the same day	Positive association Percent change of hospitalization per 10 µg/m <sup>3</sup> increase in PM <sub>2.5</sub> Single-pollutant model 0.44 (0.23,0.64) <i>p</i> < 0.001 Two-pollutant model 0.43 (0.21, 0.64) <i>p</i> = 0.001
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for peritonitis and intestinal abscess	Adult	Single-day exposure of the same day	Positive association Percent change of hospitalization per 10 µg/m <sup>3</sup> increase in PM <sub>2.5</sub> Single-pollutant model 0.57 (0.13,1.00) <i>p</i> = 0.049 Two-pollutant model: not significant

CI, confidence interval; HR, hazard ratio; IBD, inflammatory bowel disease; OR, odds ratio; PM<sub>2.5</sub>, particulate matter ≤2.5 µm.

ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

Contrary to PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> exposure was found to decrease the risk of IBD during adulthood (Table 3) (Opstelten et al., 2016). Consistently, high PM<sub>10</sub> concentrations in living areas decreased the risk of CD (Kaplan et al., 2010). PM<sub>10</sub> concentrations did not affect hospital visits for gastroenteric disorder in children (Orazio et al., 2009), but increased the emergency visits for enteritis (Xu et al., 2016), appendicitis (Chen and Yang, 2018; Kaplan et al., 2009), and peptic ulcer (Tsai et al., 2019). The contrast between the negative effects of PM<sub>10</sub> exposure on IBD development and its promoting effects on hospitalizations for intestinal diseases remains unexplained to date.

2.3. Effects of atmospheric gas on intestinal health

Literature data assessing the relationship between atmospheric gas exposure and intestinal health are summarized below.

2.3.1. NO<sub>2</sub>

In the study by Opstelten et al., NO<sub>2</sub> atmospheric levels did not impact IBD, CD, or UC incidence in adulthood (Table 4) (Opstelten et al., 2016). However, stratified analyses by age showed that high NO<sub>2</sub> concentrations in living areas were associated with an increased risk of CD for those aged <23 years and a decreased risk of CD for those aged 44–57 years (Kaplan et al., 2010), suggesting that NO<sub>2</sub> could have age-specific effects on the development of CD. In the study by Elten et al., maternal or early-life exposure to NO<sub>2</sub> did not show significant effects on pediatric onset IBD-risk (Elten et al., 2020). However, increased NO<sub>2</sub> concentration was associated with an increased IBS incidence in children (Tan et al., 2019). High NO<sub>2</sub> exposure has been consistently associated with an increased risk of appendicitis (Chen and Yang, 2018; Kaplan et al., 2009). NO concentration has been positively associated with hospitalizations for IBD in adults (Ananthakrishnan et al., 2011). Increased NO<sub>2</sub> concentration has been also associated with an increased hospitalization rate for non-specific abdominal pain (Kaplan et al., 2012), enteritis (Xu et al., 2016), and peptic ulcer (Kaplan et al., 2010), whereas it had no effect on emergency visits for gastroenteric disorder (Orazio et al., 2009). As a whole, NO<sub>2</sub> exposure showed contrasting effects but has been repeatedly associated with an increased incidence of intestinal disorders.

2.3.2. SO<sub>2</sub>

High concentration of SO<sub>2</sub> in living areas increased the risk of UC in patients <25 years (Table 5) (Kaplan et al., 2010). A significant association has been found between SO<sub>2</sub> exposure and emergency visits for gastroenteric disorder in children 2 years of age and younger (Orazio et al., 2009). Increased SO<sub>2</sub> atmospheric concentration has been associated with increased hospital visits for IBD (Ananthakrishnan et al., 2011), non-specific abdominal pain (Kaplan et al., 2012), and enteritis (Xu et al., 2016). Higher SO<sub>2</sub> concentration during warm days has been shown to increase emergency visits for appendicitis (Kaplan et al., 2009) and peptic ulcer (Tsai et al., 2019). Most studies in this area have reported negative effects of SO<sub>2</sub> exposure on intestinal diseases.

2.3.3. O<sub>3</sub>

In the study by Elten et al., there was no association between O<sub>3</sub> exposure and pediatric IBD development (Table 6) (Elten et al., 2020). Similarly, no significant association has been found between O<sub>3</sub> exposure and hospitalization for gastroenteric disorder in children (Orazio et al., 2009) and for enteritis in adults (Xu et al., 2016). O<sub>3</sub> exposure has been associated with a decreased emergency visits for CD in adults (Pezhman et al., 2016) and for non-specific abdominal pain (Kaplan et al., 2012). Conversely, high level of O<sub>3</sub> exposure has been repeatedly associated with increased hospitalization for appendicitis (Chen and Yang, 2018; Kaplan et al., 2009, 2013). Higher levels of ambient O<sub>3</sub> exposure could also increase the risk of perforated appendicitis (Kaplan et al., 2013). Ambient O<sub>3</sub> exposure has been shown to enhance the risk of hospitalization for peptic ulcer (Tsai et al., 2019). Lastly, a recent study did not find significant associations between O<sub>3</sub> exposure and hospitalization for digestive diseases, neither as a broad category nor for specific digestive diseases subcategories, including appendicitis (Gu et al., 2020). Therefore, O<sub>3</sub> exposure showed contrasting effects on intestinal disorders and its consequences remain unclear.

2.3.4. CO

Increased CO concentration has been associated with a higher risk of IBS incidence in children (Table 7) (Tan et al., 2019). Increased CO

**Table 3**  
Overview of studies on the effects of PM<sub>10</sub> on human intestinal health.

Reference	Condition with which there is association	Exposure window	Exposure duration	Reported effects
Opstelten JL, et al. Dig. Dis. Sci. 2016	IBD development	Adult	Pollution parameters measured within 1 year during three different seasons between 2008 and 2011	Negative association OR 0.25, 95% CI 0.08–0.78 per 10 µg/m <sup>3</sup> , p trend = 0.04
Kaplan GG, et al. Am. J. Gastroenterol. 2010	CD development	44–57 years	High concentration in living area	Negative association OR 0.48, 95% CI 0.29–0.80
Orazio F, et al. Environ. Health Perspect. 2009	Hospitalization for gastroenteric disorder	Children 0–2 years	Up to 6 days before emergency visit	No association
Xu C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2016	Hospitalization for enteritis	Adult	10 µg/m <sup>3</sup> increase on the concurrent days	Positive association Percent change 0.58 95% CI 0.19–0.97 p < 0.05
Kaplan GG et al. CMAJ 2009	Hospitalization for appendicitis	Adult	5-day daily mean pollutant concentration (interquartile range)	Positive association during summer OR 1.20, 95% CI 1.05–1.38
Chen C–C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2018	Hospitalization for appendicitis	Adult	Interquartile range increase 26.07 µg/m <sup>3</sup>	Positive association Cool days <23 °C OR 1.05 95% CI 1.02–1.07
Tsai S–S et al. Int. J. Environ. Res. Public. Health 2019	Hospitalization for peptic ulcers	Adult	2009–2013 ambient air pollutants exposure	Whole period: OR 1.0, 95% CI:0.98–1.02, ns Warm days (>23 °C): OR 1.05, 95% CI:1.01–1.08, p < 0.05 Cold days (<23 °C): OR 1.04, 95% CI:1.02–1.07, p < 0.05

CI, confidence interval; CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; OR, odds ratio; PM<sub>10</sub>, particulate matter ≤10 µm.



ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

**Table 4**  
Overview of studies on the effects of NO<sub>2</sub> on human intestinal health.

Reference	Condition with which there is association	Exposure window	Exposure duration	Reported effects
Opstelten JL, et al. Dig. Dis. Sci. 2016	NO <sub>2</sub> IBD/CD/UC development	Adulthood	Pollution parameters measured within 1 year during three different seasons between 2008 and 2011	No association
Kaplan GG, et al. Am. J. Gastroenterol. 2010	NO <sub>2</sub> CD development	≤23 years	High concentration in living area	Positive association OR 2.31, 95% CI 1.25–4.28
Kaplan GG, et al. Am. J. Gastroenterol. 2010	NO <sub>2</sub> CD development	44–57 years	High concentration in living area	Negative association OR 0.56, 95% CI = 0.33–0.95
Eiten M, et al. Environ. Int. 2020	NO <sub>2</sub> IBD development	Pediatric-onset IBD diagnosis	Trimester 1/Trimester 2/Trimester 3	No association
Tan T-K, et al. J. Neurogastroenterol. Motil. 2019	NO <sub>2</sub> IBS incidence	Children	Pregnancy/Childhood	No association
Kaplan GG et al. CMAJ 2009	NO <sub>2</sub> Hospitalization for appendicitis	Adult	Daily average pollutant concentration (categorized into quartile groups)	Positive association HR 2.14 (95% CI: 1.88, 2.43) <i>p</i> < 0.001 in quartile 4 compared to quartile 1
Chen C—C et al. J toxicol Environ health 2018	NO <sub>2</sub> Hospitalization for appendicitis	Adult	Summer 5-day daily mean pollutant concentration (interquartile range) Interquartile range increase 8.18 ppb	Positive association OR 1.76, 95% CI 1.20–2.58 Positive association Warm days ≥23 °C OR 1.14, 95% CI 1.10–1.19, <i>p</i> < 0.05 Cool days <23°C OR 1.08, 95% CI 1.04–1.12, <i>p</i> < 0.05
Ananthakrishnan AN, et al. Inflamm. Bowel Dis. 2011	NO Hospitalization for IBD	Adult	Average annual emissions density	Positive association Incidence rate ratio 1.19, 95% CI: 1.14–1.25, <i>p</i> < 0.001
Kaplan GG, et al. PloS One 2012	NO <sub>2</sub> Hospitalization for non-specific abdominal pain	15–24 years	Same day air pollutant concentration	Positive association Edmonton: OR 1.06, 95% CI 1.03–1.09 Montreal: OR 1.09, 95% CI 1.01–1.16
Xu C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2016	NO <sub>2</sub> Enteritis	Adult	10 µg/m <sup>3</sup> increase on the concurrent days	Positive association Percent change 4.19 95% CI 1.65–6.72 <i>p</i> < 0.05
Tsai S—S et al. Int. J. Environ. Res. Public. Health 2019	NO <sub>2</sub> Hospitalization for peptic ulcers	Adult	2009–2013 ambient air pollutants exposure	Positive association Warm days (>23 °C) OR 1.16, 95% CI 1.12–1.20, <i>p</i> < 0.05 Cool days (<23 °C): OR 1.07, 95% CI 1.04–1.11, <i>p</i> < 0.05
Orazio F, et al. Environ. Health Perspect. 2009	NO <sub>2</sub> Hospitalization for gastroenteric disorder	Children 0–2 years	Up to 6 days before emergency visit	No association

CI, confidence interval; CD, Crohn's disease; HR, hazard ratio; IBD, inflammatory bowel disease; IBS, irritable bowel syndrome; NO<sub>2</sub>, nitrogen dioxide; NO, nitrous oxide; OR, odds ratio; UC, ulcerative colitis.

**Table 5**  
Overview of studies on the effects of SO<sub>2</sub> on human intestinal health.

Reference	Condition with which there is association	Exposure window	Exposure duration	Reported effects
Kaplan GG, et al. Am. J. Gastroenterol. 2010	UC development	≤25 years	High concentration in living area	Positive association OR 2.00, 95% CI = 1.08–3.72
Orazio F, et al. Environ. Health Perspect. 2009	Hospitalization for gastroenteric disorder	Children 0–2 years	Up to 6 days before emergency visit	Positive association between the 7-day moving average SO <sub>2</sub> and gastroenteric disorders 8.5% increase, 95% CI, 0.6 to 16.9
Ananthakrishnan AN, et al. Inflamm. Bowel Dis. 2011	Hospitalization for IBD	Adult	Average annual emissions density	Positive association Incidence rate ratio 1.04, 95% CI: 1.02–1.06, <i>p</i> < 0.001
Kaplan GG, et al. PloS One 2012	Hospitalization for non-specific abdominal pain	15–24 years	Same day air pollutant concentration	Positive association Edmonton OR 1.02, 95%CI = 1.00–1.04 Montreal OR 1.17, 95% CI = 1.10–1.25
Xu C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2016	Enteritis	Adult	10 µg/m <sup>3</sup> increase on the concurrent days	Positive association Percent change 2.88, 95% CI 0.25–5.52 <i>p</i> < 0.05
Kaplan GG et al. CMAJ 2009	Hospitalization for appendicitis	Adult	Summer 5-day daily mean pollutant concentration (interquartile range)	Positive association OR 1.30, 95% CI 1.03–1.63
Chen C—C et al. J toxicol Environ health 2018	Hospitalization for appendicitis	Adult	Interquartile range increase 1.71 ppb	No association
Tsai S—S et al. Int. J. Environ. Res. Public. Health 2019	Hospitalization for peptic ulcers	Adult	2009–2013 ambient air pollutants exposure	Positive association Warm days (>23 °C) OR 1.04, 95% CI 1.00–1.08, <i>p</i> < 0.05

CI, confidence interval; IBD, inflammatory bowel disease; OR, odds ratio; SO<sub>2</sub>, sulfur dioxide; UC, ulcerative colitis.

ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

**Table 6**  
Overview of studies on the effects of O<sub>3</sub> on human intestinal health.

References	Condition with which there is association	Exposure window	Exposure duration	Reported effects
Elten M, et al. Environ. Int. 2020	IBD development	Pediatric-onset IBD diagnosis	Trimester 1/Trimester 2 Trimester 3/Pregnancy Childhood	No association
Orazzo F, et al. Environ. Health Perspect. 2009	Hospitalization for gastroenteric disorder	Children 0–2 years	Up to 6 days before emergency visit	No association
Xu C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2016	Hospitalization for enteritis	Adult	10 µg/m <sup>3</sup> increase on the concurrent days	No association
Pezhman et al. Govaresh. 2016	Hospitalization for CD	Adult	10 month average air pollutant concentration	Negative association between O <sub>3</sub> concentration and number and duration of admissions due to CD ( <i>p</i> = 0.016 and 0.006, Correlation Coefficient –0.338 & –0.413 respectively).
Kaplan GG, et al. PloS One 2012	Hospitalization for non-specific abdominal pain	15–24 years	Same day air pollutant concentration	Negative association in Edmonton OR 1.06, 95% CI = 1.03–1.09 No association in Montreal OR 1.03, 95% CI = 0.95–1.11
Kaplan GG et al. CMAJ 2009	Hospitalization for appendicitis	Adult	Summer 5-day daily mean pollutant concentration (interquartile range)	Positive association OR 1.32, 95% CI 1.10–1.57
Kaplan GG et al. Environ. Health Perspect. 2013	Appendicitis phenotype	Adult	7 day average cumulative daily maximum pollutant concentration	Positive association 7-day cumulative average daily maximum O <sub>3</sub> concentration associated with all appendicitis cases across the 12 cities (pooled OR = 1.07, 95% CI: 1.02, 1.13). +Higher levels of ambient O <sub>3</sub> exposure may increase the risk of perforated appendicitis. OR = 1.22, 95% CI: 1.09, 1.36
Chen C–C et al. J toxicol Environ health 2018	Hospitalization for appendicitis	Adult	Interquartile range increase 12.83 ppb	Positive association Warm days ≥23 °C OR 1.10, 95% CI 1.06–1.15, <i>p</i> < 0.05 Cool days <23° OR 1.25, 95% CI 1.18–1.31, <i>p</i> < 0.05
Tsai S–S et al. Int. J. Environ. Res. Public. Health 2019	Hospitalization for peptic ulcers	Adult	2009–2013 ambient air pollutant exposure	Positive association Warm days (>23 °C): OR 1.11, 95% CI 1.07–1.15, <i>p</i> < 0.05 Cool days: OR 1.23, 95% CI 1.17–1.28, <i>p</i> < 0.05
Gu J et al. PLoS Med 2020	Hospitalization for diseases of the digestive system	Adult	Two-day moving average exposure	No association

CI, confidence interval; CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; O<sub>3</sub>, ozone; OR, odds ratio.

exposure has been positively correlated with emergency visits for gastroenteric disorder in children 2 years of age and younger (Orazzo et al., 2009) and with hospital visits for numerous intestinal disorders in adults, namely IBD (Ananthakrishnan et al., 2011), non-specific

abdominal pain (Kaplan et al., 2012), enteritis (Xu et al., 2016), appendicitis (Chen and Yang, 2018; Kaplan et al., 2009), and peptic ulcer (Tsai et al., 2019). Overall, most studies on CO exposure have reported harmful effects on intestinal diseases.

**Table 7**  
Overview of studies on the effects of CO on human intestinal health.

Reference	Condition with which there is association	Exposure window	Exposure duration	Reported effects
Tan T-K, et al. J. Neurogastroenterol. Motil. 2019	IBS incidence	Children	Daily average pollutant concentration (categorized into quartile groups)	Positive association Hazard ratio 1.98, 95% CI: 1.75, 2.26, <i>p</i> < 0.001 in quartile 4 compared to quartile 1
Orazzo F, et al. Environ. Health Perspect. 2009	Hospitalization for gastroenteric disorder	Children 0–2 years	3-day moving average CO before emergency visit	Positive association 3.8% increase, 95% CI, 1.0–6.8
Ananthakrishnan AN, et al. Inflamm. Bowel Dis. 2011	Hospitalization for IBD	Adult	Average annual emissions density	Positive association Incidence rate ratio 1.03, 95% CI:1.01–1.05, <i>p</i> = 0.01
Kaplan GG, et al. PloS One 2012	Hospitalization for non-specific abdominal pain	15–24 years	Same day air pollutant concentration	Positive association: Edmonton OR 1.04, 95% CI = 1.02–1.06 Montreal OR 1.04, 95% CI = 1.02–1.06
Xu C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2016	Hospitalization for enteritis	Adult	0.1 mg/m <sup>3</sup> increase on the concurrent days	Negative association Percent change-0.11 95% CI –1.12–0.91, <i>p</i> < 0.05
Kaplan GG et al. CMAJ 2009	Hospitalization for appendicitis	Adult	Summer 5-day daily mean pollutant concentration (interquartile range)	Positive association OR 1.35, 95% CI 1.01–1.80
Chen C–C et al. J. Toxicol. Environ. Health A 2018	Hospitalization for appendicitis	Adult	Interquartile range increase 0.27 ppm	Positive association Warm days OR 1.16, 95% CI 1.11–1.21, <i>p</i> < 0.05
Tsai S–S et al. Int. J. Environ. Res. Public. Health 2019	Hospitalization for peptic ulcers	Adult	2009–2013 ambient air pollutant exposure Warm days	Positive association on warm days (>23 °C): OR 1.17, 95% CI 1.12–1.21, <i>p</i> < 0.05

Footnotes: CI, confidence interval; CO, carbon monoxide; HR, hazard ratio; IBD, inflammatory bowel disease; IBS, irritable bowel syndrome; OR, odds ratio.



## ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

## 2.4. Effects of VOCs on intestinal health

VOCs are a generic term for organic chemicals whose boiling point is low and thus these compounds volatilize easily into the atmosphere at room temperature (US EPA, 2014). VOCs include aromatic hydrocarbons, aliphatics, aldehydes, ketones, ethers, acids, and alcohols, with diverse functional groups (halogens, oxygen, sulfur, nitrogen or phosphorus, but excluding carbon oxides and carbonates) (Montero-Montoya et al., 2018). The main compounds of interest consist of aromatics such as benzene, toluene, xylene, ethylbenzene, and aldehydes, such as formaldehyde and acetaldehyde (Spinelle et al., 2017).

Few epidemiological studies have evaluated the link between VOC exposure and intestinal health. In the study of Ananthakrishnan et al., the rate of IBD hospitalization was significantly associated with VOC emission density (OR = 1.52,  $p < 0.001$ ) (Ananthakrishnan et al., 2011). Several studies have linked occupational VOC exposures to cancers of the digestive tract. For example, in a population-based case-control study carried out from Canada, limited evidence was found for increased risk of esophagus, colon, or rectum cancers and occupational exposure to toluene, xylene, or styrene (Gérin et al., 1998). A case-control study showed results in favor of a positive association between rectal cancer and several VOCs such as formaldehyde, carbon tetrachloride, methylene chloride, trichloroethylene, acetone, aliphatic ketones, aliphatic esters, toluene, and styrene (Dumas et al., 2000). Another population-based case-control study performed in Canada extended these results and showed an increased colon cancer risk for occupational exposure to aliphatic ketones (OR<sub>subst</sub> = 1.9, 95% CI 1.0–3.5), benzene (OR<sub>subst</sub> = 1.9, 95% CI 1.1–3.3), xylene (OR<sub>subst</sub> = 1.9, 95% CI 0.8–4.3), and toluene (OR<sub>subst</sub> = 1.6, 95% CI 1.0–2.7) (Goldberg et al., 2001). Moreover, in a case-control study performed in northern Europe, benzene occupational exposure was found to be associated with colorectal cancer incidence (OR = 1.12, 95% CI 1.05–1.18) that followed a statistically significant dose-response relationship. This excess risk was mainly seen in ascending (OR = 1.27, 95% CI 1.13–1.43) and transverse (OR = 1.21, 95% CI 1.01–1.41) colon. The ORs in the highest exposure category were markedly higher in women than in men in all subsites of colon and rectum (Talibov et al., 2018). Acetaldehyde has been extensively studied as a metabolite of ethanol and its involvement in alcohol-related upper gastrointestinal tract carcinogenesis is well-recognized (Basuroy et al., 2005). Nevertheless, no study has analyzed its effects following inhalation either in humans or in animals. However, two cohort studies of dry-cleaning workers indicated an excess risk of esophageal cancer associated with perchloroethylene exposure (Blair et al., 1990; Ruder et al., 1994).

## 3. Effects of air pollutants on intestinal microbiota in humans

To date, four studies have shown an association between exposure to air pollutants and changes of gut microbiota. In the first study, freeway traffic-related air pollution was correlated with decreased *Bacteroidaceae* ( $r = -0.48$ ;  $p = 0.001$ ) and increased *Coriobacteriaceae* families ( $r = 0.48$ ;  $p < 0.001$ ) in overweight and obese adolescents (Alderete et al., 2018).

Another study has examined the association between exposure to PM and modifications of gut microbiota in humans (Liu et al., 2019). A total of 6627 adults with or without type 2 diabetes from south China were examined. The results found that exposure to both PM<sub>2.5</sub> and particulate matter pollution with aerodynamic diameters  $< 1 \mu\text{m}$  (PM<sub>1</sub>) was negatively associated with alpha diversity indices of the gut microbiota. PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>1</sub> exposure was also negatively associated with *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia* and was associated with several taxa within the *Bacteroidetes* phyla.

The final two studies were conducted in healthy subjects. The third study demonstrated significant associations between exposure to air pollutants and the gut microbiome in young adults residing in southern California (Fouladi et al., 2020). At the phylum level, the percent

variation in gut bacterial composition that was explained by exposure to air pollutants was 4.0% for total nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>, false discovery rate (FDR)-corrected  $p = 0.049$ ), 4.4% for NO<sub>2</sub> (FDR-corrected  $p = 0.049$ ), and 11.2% for O<sub>3</sub> concentrations (FDR-corrected  $p = 0.001$ ). At the species level, O<sub>3</sub> exposure explained 5.4% of the variation in gut bacterial composition (FDR-corrected  $p = 0.001$ ). The authors built simple univariate linear regression models for ambient and near-roadway air pollutants including total NO<sub>x</sub>, NO<sub>2</sub>, PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub>, and O<sub>3</sub> exposure as well as potentially important confounding subject metadata including sex, body mass index, age, energy intake, season, parental education, and Hispanic ethnicity. They found that 128 bacterial species were associated with O<sub>3</sub>, and 4 and 5 bacterial species were associated with NO<sub>2</sub> and total NO<sub>x</sub>, respectively.

The last study investigated the association between atmospheric PAH exposure and the diversity of microbiota (Hu et al., 2020). The authors detected a positive correlation between the abundance of the genus *Micrococcus* within *Actinobacteria* and levels of high molecular weight PAHs such as dibenzo(*a,h*)anthracene and indeno(1,2,3-*cd*)pyrene. In addition, they found a positive correlation between the abundance of *Bacillus*-like genera (*Firmicutes*) in the atmosphere and low molecular weight PAHs, including anthracene, fluoranthene, fluorene, and phenanthrene. Functional enrichment analysis suggested that PAH exposure may disturb signaling pathways through imbalance of commensal microbiota, such as purine metabolism, pyrimidine metabolites, lipid metabolism, and one carbon pool by folate, which may contribute to public health issues. In conclusion, various atmospheric pollutants have been associated with modifications of gut microbiota in humans.

## 4. Evidence of air pollution effects on intestinal health in animals

Since some inhaled particles were shown to be cleared via the digestive tract, their effects on gut health have received increasing attention in recent years (Semmler-Behnke et al., 2007). Indeed, not all particles reach the lungs after inhalation and their circulation partly depends upon their size. The largest particles can get trapped in the mucus of the nasal cavity, mouth, and pharynx (aerodynamic diameter from 5 to 10  $\mu\text{m}$ ), and in the mucus produced by the bronchial epithelium for the particles in the range of 2.5 to 5  $\mu\text{m}$  in size. These particles are cleared by mucociliary transport into the throat and expectorated or swallowed thus reaching the intestinal tract (Asgharian et al., 2001; Smith et al., 2002). Fine and ultrafine particles (aerodynamic diameter  $\leq 2.5 \mu\text{m}$ ) can reach the alveolar region of the lungs (Labiris and Dolovich, 2003). Moreover, particles are also made of a water-soluble fraction which can be absorbed via the airway epithelium and circulate into the blood or lymphatic system to potentially induce systemic effects.

To assess the intestinal effects of air pollution, animal studies have been conducted using several different study designs. One major difference among the animal approaches lays in the route of animal exposure, which can either be through gavage, intranasal instillation or inhalation in closed chambers. Studies which utilize the gavage and intranasal instillation routes have the advantage of controlling the delivery dose to the animal, however, they do not allow physiological reproduction of human exposure. Inhalation protocols recapitulate air pollution and the PM behavior in the thoracic and extra-thoracic regions, being thus more representative of real-world exposures. For this reason, we decided to only review publications that incorporate an inhalation protocol. Our search identified several studies on inhalation of PM, but no studies that focused on inhalation of atmospheric gas or VOCs.

Collectively, the current literature on inhalation exposures in animals has identified mechanisms involving components of the intestinal homeostasis. The gastrointestinal tract mucosa forms a physical and functional barrier between the environment and the internal host milieu. Facing thousands of compounds daily, the gastrointestinal tract mucosa has developed a complex system to limit the entry of



## ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

potentially harmful antigens and microorganisms, while being semipermeable to nutrients or immune sensing. Several mechanisms related to an alteration of the intestinal barrier have been described for PM-induced deleterious effects on intestinal health. A direct effect on epithelial cells has been shown: epithelial lesions were observed in the colon of mice exposed for 3 and 12 months, 2 h/day, 5 days/week, to urban commercial PM (SRM 1648a, mean diameter 5.85  $\mu\text{m}$ , mean concentration of 0.4  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) or to 1 h per day for 28 consecutive days to ultrafine diesel exhaust particles (DEPs, SRM 2975, mean diameter 31.9  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (Li et al., 2019a, 2019b). This effect could be mediated either by a direct cellular toxicity or by oxidative stress. Indeed, urban PM (SRM 1649a, mean diameter 12.9  $\mu\text{m}$ ) induced apoptosis and generated reactive oxygen species in Caco-2 cells in vitro (Mutlu et al., 2011). In mice, serum malondialdehyde concentration was induced by coarse PM exposure for 15 days (urban PM, aerodynamic diameter from 2.1 to 10.2  $\mu\text{m}$ , inhalation 4 h/day, 5 days/week) (Vignal et al., 2017). Epithelial injury was accompanied by increased inflammation and pro-inflammatory cytokines in the colon of mice exposed to coarse PM or to  $\text{PM}_{2.5}$  (concentrated from ambient air in Chicago, USA, 8 h/day for 5 days a week for a total of 3 consecutive weeks in a chamber connected to a versatile aerosol concentration enrichment system,  $135.4 \pm 6.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (Mutlu et al., 2018; Vignal et al., 2017). Upregulation of key molecules of inflammatory pathways (Stat3 and p65) (Li et al., 2019a) and infiltration of colon by inflammatory cells (Li et al., 2019a, 2019b) were also observed under these conditions. Antioxidant strategies using either D-4F peptide (mimetic peptide of apolipoprotein A-I) or N-acetyl-L-cysteine were demonstrated to mitigate PM-mediated gut injury, supporting the involvement of imbalanced intestinal redox pathways for the observed effects (Vignal et al., 2017; Wang et al., 2018).

Deleterious effects of PM inhalation were also reported on gut microbiota (Li et al., 2019b; Mutlu et al., 2018; Wang et al., 2018). In mice exposed to concentrated ambient  $\text{PM}_{2.5}$  from Shanghai, China, for 12 months using a versatile aerosol concentration enrichment system (8 h/day, 6 days/week,  $276.2 \pm 170.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), fecal microbiota metagenomics analysis revealed that 24 bacterial and 21 fungal taxa showed differential abundance compared to control-exposed animals, suggesting that chronic exposure to  $\text{PM}_{2.5}$  causes gut dysbiosis (Wang et al., 2018). Microbiota changes have also been observed with shorter exposure times. Mutlu et al. characterized microbiota in stomach, small intestine, cecum, colon, and stool of mice exposed to  $\text{PM}_{2.5}$  concentrated from ambient air in Chicago for 3 weeks (Mutlu et al., 2018). PM exposure altered the microbiota composition along the entire gastrointestinal tract, with a more prominent dysbiosis from the proximal to distal parts and favoring some bacterial taxa over others. At the phylum level, they found a significant reduction in *Firmicutes* in the PM-exposed group at all sites. At lower taxonomic levels, the observed differences pointed towards an enhancement of some bacterial taxa such as unnamed genera within *Lactobacillaceae*, *Rikenellaceae*, and *S24\_7* families after exposure to  $\text{PM}_{2.5}$ . In mice exposed to DEPs for 1 h/day, Li et al. showed that the abundance of *Lactobacillus* in feces was transiently increased following a 7-day exposure and then decreased until the end of a 28-day exposure (Li et al., 2019b). Moreover, this study showed the first evidence for a causal effect on gut microbiota. Indeed, fecal microbiota transplant experiments demonstrated that non-exposed mice receiving gut microbiota from DEP-exposed mice recapitulated the phenotype of epithelial injury observed in the exposed mice.

Adequate equilibrium between the intestinal mucosa, the immune system, and the gut microbiota is essential for maintaining gut homeostasis; breakdown in these pathways may precipitate diseases. Deleterious effects of inhaled PM on the intestine have been explored in several genetically-deficient mice, showing similar mechanisms of action as in wild-type mice. In atherosclerotic models, exposure to urban UFP (Ldlr-null mice exposed for 5 h/day, 3 days/week for 10 weeks in whole-body exposure chambers,  $360 \pm 25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) or to diesel exhaust (Apolipoprotein E-deficient mice exposed 6 h/day, 5 days/week for 2

weeks,  $\sim 250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) increased intestinal levels of oxidative products of arachidonic and linoleic acids (Li et al., 2015; Yin et al., 2013). This was accompanied by changes in intestinal architecture: decreased villus length in Ldlr-null mice exposed to UFP; and decreased Muc2 and tight junction proteins expression in Apolipoprotein E-deficient mice on high fat diet after exposure to wood smoke (WS,  $\sim 450 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) or mixed diesel and gasoline vehicle exhaust (MVE,  $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) 6 h/day, 7 days/week, for 50 days (Fitch et al., 2020; Li et al., 2015). PM exposure induced inflammation as indicated by increased MMP-9, TLR-4, and cytokine expression in WS- or MVE-exposed ApoE-deficient mice and infiltration of macrophages and neutrophils in the intestinal villi of UFP-exposed Ldlr-null mice. WS and MVE exposure also resulted in decreased intestinal bacterial diversity, as well as alterations in microbiota profiles including the *Firmicutes*:*Bacteroidetes* ratio at the phylum level. Similarly, in a mouse model of Alzheimer's disease (APP/PS1 transgenic mice),  $\text{PM}_{2.5}$  exposure (8 weeks in an ambient air whole-body inhalation exposure system located in Taiyuan, China, with a mean  $\text{PM}_{2.5}$  concentration of 61  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) has been shown to aggravate intestinal histopathological damage and stimulate secretion of pro-inflammatory cytokines (Fu et al., 2020). Compared with the wild-type and Alzheimer's disease groups exposed to filtered air, the Alzheimer's disease group exposed to  $\text{PM}_{2.5}$  had the highest Shannon, Simpson, Chao1, and Abundance-based coverage (ACE) indices which reflect the diversity and richness of the intestinal bacterial communities. In the latter group, this was correlated with variations of vital genes and metabolic pathways in the bacterial community identified by KEGG pathway analysis. This study indicated that the intestinal susceptibility of mice which model Alzheimer's disease was worsened by  $\text{PM}_{2.5}$  exposure. In a mouse model of colorectal cancer, urban PM (SRM 1648a) exposure accelerated tumorigenesis (Li et al., 2019a). Mechanistically, FGFR4-triggered activation of the PI3K/AKT pathway played a key role in the PM-accelerated progression of colorectal tumor formation. Upregulation of carbonic anhydrase 9 expression, a glycoprotein involved in colorectal cancer development, has been described in the colon of mice exposed to DEP (Li et al., 2019b; Pastorekova and Gillies, 2019).

## 5. Conclusions

The epidemiological studies that we reviewed have measured air pollution exposure using different methodologies and have investigated various intestinal outcomes through observational designs only. As a whole they suggest that air pollution exposure could cause gastrointestinal tissue defects, but above all they highlight the complexity of these relationships. For example, each component of air pollution could have similar or opposite effects. For instance, IBD incidence was found to be negatively associated with  $\text{PM}_{2.5}$  and  $\text{PM}_{10}$  exposures, but positively with  $\text{SO}_2$  exposure (Ananthakrishnan et al., 2011; Kaplan et al., 2010; Opstelten et al., 2016). Since humans are exposed to several pollutants simultaneously, it is therefore difficult to discern the individual role of a specific pollutant. Moreover, the same air pollutants could have different effects according to their origin: in vitro studies found different impacts of PM regarding their urban, industrial, traffic-related, or rural constitution, and this parameter has not been taken into account thus far in epidemiological studies. Some studies have found positive associations between some air pollutants and intestinal diseases only on warm days (Chen and Yang, 2018; Kaplan et al., 2009; Tsai et al., 2019), highlighting the seasonal effects of pollutants. They are also age-dependent and this has been shown by the positive association between IBD incidence and the redox-weighted oxidant capacity of air pollution during childhood and the second trimester of pregnancy, but not during the first or third trimesters nor the whole pregnancy (Opstelten et al., 2016). As for most pollutants, there are vulnerability periods during which individuals exhibit an enhanced susceptibility to harmful effects, and this temporal weakness could manifest only after many years. Furthermore, the impact of air pollutants could depend upon the length of exposure. Some effects could appear after chronic



## ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

exposure and potentiate the development of diseases appearing after one or more decades such as UC or colorectal cancer (Laharie et al., 2001). On the other hand, other effects of air pollutants could emerge after only a few days of exposure, as suggested by the studies showing increased levels of hospitalizations for intestinal disorders after 1 to 6 days exposure (Kaplan et al., 2009, 2012; Orazzo et al., 2009).

Despite this complexity, there is a clear consistency among the studies indicating the deleterious impact of SO<sub>2</sub> on gastrointestinal disorders. Positive associations have been found between SO<sub>2</sub> exposure and IBD, gastroenteritis, appendicitis, abdominal pain, and peptic ulcers. Studies included both children and adults, and both short- and long-term exposures. Similarly, the effects of NO<sub>2</sub> and CO exposure have been reported as detrimental in numerous epidemiological studies, demonstrating broad range intestinal damage in various exposure conditions.

Lastly, it should be noted that epidemiological studies on air pollution and intestinal health are only retrospective, rarely population-based, and with a priori knowledge. It is important to develop prospective studies such as exposed-unexposed studies or ecological regression studies which require case exhaustiveness, fine spatial unit resolution, and robust and complete pollution data records.

Research evaluating the effects of air pollution on the microbiota in humans is still in its infancy. Animal inhalation studies assessing the role of air pollution on intestinal health are sparse, recent, and mainly focused on PM. In the studies that we have reviewed, analyzed particles were different in terms of size (from ultrafine to coarse) and composition (global urban PM; vehicle or wood smoke exhaust particles). The study designs were also diverse in terms of dose and duration of exposure. Nevertheless, the results tended to converge towards detrimental effects of PM on gut health whether in genetically-deficient or wild-type strains. The identified mechanisms included gut epithelial injury, oxidative stress, inflammation, and dysbiosis; all involved increased intestinal permeability which can promote the development of gastrointestinal and extra-intestinal diseases (Bhattacharyya et al., 2014; Chelakkot et al., 2018). The alterations of bacterial richness and diversity were sometimes inconsistent between studies. As mentioned earlier, the types of particles analyzed as well as protocol design were different between the studies, which might help explain the discrepancy of dysbiosis features. Importantly, all studies consistently observed a reduced abundance of *Lactobacillus* in PM-exposed mice, suggesting a protective effect of this bacterial genus. *Lactobacillus* genus is traditionally considered to have a positive impact on intestinal health and is a component of many fermented foods and probiotics (Sanders et al., 2019). *Lactobacillus* supplementation has been demonstrated to protect the colonic epithelium from DEP-induced effects, supporting a potential clinical application (Li et al., 2019b). Together, reviewed animal studies have demonstrated deleterious effects of PM on intestinal health either directly on epithelial cells or indirectly through microbiota modifications. Several treatments, which have already shown their efficacy in gastrointestinal disorders (e.g. antioxidants, probiotics, and curcumin), were also efficient in dampening particulate-induced injury.

Despite recent advances in understanding the effects of air particles on intestinal health, several questions remain unanswered. Inhalation protocols can lead to intestinal exposure either topically after swallowing or systemically via the soluble fraction of PM. It remains to be determined whether the intestinal effect of PM exposure results from local or systemic mechanisms. This question has been addressed experimentally by studies that assessed the impact of air pollutants (PM, metals, etc) administered by gavage or through drinking water (Dujardin et al., 2020; Feng et al., 2020). These studies highlighted the detrimental outcomes of air pollutant exposure on gut health that paralleled the observed effects on cell injury, inflammation, and gut dysbiosis from inhalation protocols. However, those studies were conducted with higher concentrations more relevant to dietary contamination. As air pollution has been demonstrated to impact distal sites such as brain and heart, the effect on intestine through a systemic

mechanism can also be considered (Fu et al., 2020; Maglione et al., 2020). Furthermore, epidemiological studies have highlighted an age-dependency of air pollution effects which was not studied in animals, and these investigations would help to better understand mechanisms involved in air pollution-induced disease susceptibility.

The chemical composition of PM is another important determinant of its health outcomes. PM is dependent on emission source, and published studies have assessed the effects of urban particles, which are most likely enriched with toxic metals, compared to rural particles where composition is influenced by local vegetation, agricultural activities, or rural roadways (Kundu and Stone, 2014). Although the cardiovascular impact of rural coarse particulates has been demonstrated, overall the effects of these pollutants are largely unknown and further studies on their intestinal health effects would be worthwhile to provide additional information regarding the responsible PM components (Brook et al., 2014). Lastly, despite epidemiological studies which have consistently shown an impact of gaseous pollutants (SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO) on gut disorders, animal studies have not been conducted to decipher these effects. Future research should aim at elucidating the underlying mechanisms.

#### CRedit authorship contribution statement

**Cécile Vignal:** Writing, reviewing. **Eva Guilloteau:** Writing. **Corinne Gower-Rousseau:** Reviewing. **Mathilde Body-Malapel:** original draft preparation, writing, reviewing.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143718>.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

The authors thank the Hauts de France Region and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (CPER Climibio) and the European Fund for Regional Economic Development for their financial support. This work was supported by the French association François Aupetit and the Lille University Hospital. Editorial assistance, in the form of language editing and correction, was provided by XpertScientific Editing and Consulting Services.

#### References

- Alderete, T.L., Jones, R.B., Chen, Z., Kim, J.S., Habre, R., Lurmann, F., Gilliland, F.D., Goran, M.L., 2018. Exposure to traffic-related air pollution and the composition of the gut microbiota in overweight and obese adolescents. *Environ. Res.* 161, 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.046>.
- Almeyahu, Y.A., Asfaw, S.L., Terfie, T.A., 2020. Exposure to urban particulate matter and its association with human health risks. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09132-1>.
- Ananthakrishnan, A.N., McGinley, E.L., Binion, D.G., Saeian, K., 2011. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1138–1145. <https://doi.org/10.1002/ibd.21455>.
- Asgharian, B., Hofmann, W., Miller, F.J., 2001. Mucociliary clearance of insoluble particles from the tracheobronchial airways of the human lung. *J. Aerosol Sci.* 32, 817–832.
- Basuroy, S., Sheth, P., Mansbach, C.M., Rao, R.K., 2005. Acetaldehyde disrupts tight junctions and adherens junctions in human colonic mucosa: protection by EGF and l-glutamine. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G367–G375. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00464.2004>.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E., 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.* 94, 329–354. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>.
- Blair, A., Stewart, P.A., Tolbert, P.E., Grauman, D., Moran, F.X., Vaught, J., Rayner, J., 1990. Cancer and other causes of death among a cohort of dry cleaners. *Br. J. Ind. Med.* 47, 162–168. <https://doi.org/10.1136/oem.47.3.162>.
- Brook, R.D., Bard, R.L., Morishita, M., Dvonch, J.T., Wang, L., Yang, H., Spino, C., Mukherjee, B., Kaplan, M.J., Yalavarthi, S., Oral, E.A., Ajluni, N., Sun, Q., Brook, J.R., Harkema, J., Rajagopalan, S., 2014. Hemodynamic, autonomic, and vascular effects of exposure



## ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx

- to coarse particulate matter air pollution from a rural location. *Environ. Health Perspect.* 122, 624–630. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306595>.
- Chelakkot, C., Ghim, J., Ryu, S.H., 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp. Mol. Med.* 50, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>.
- Chen, C.-C., Yang, C.-Y., 2018. Effects of ambient air pollution exposure on frequency of hospital admissions for appendicitis in Taipei, Taiwan. *J. Toxicol. Environ. Health A* 81, 854–860. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1498276>.
- Cincinelli, A., Martellini, T., 2017. Indoor air quality and health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14111286>.
- Cong, X., 2018. Air pollution from industrial waste gas emissions is associated with cancer incidences in Shanghai, China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 13067–13078. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1538-9>.
- Dujardin, C.E., Mars, R.A.T., Manemann, S.M., Kashyap, P.C., Clements, N.S., Hassett, L.C., Roger, V.L., 2020. Impact of air quality on the gastrointestinal microbiome: a review. *Environ. Res.* 186, 109485. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109485>.
- Dumas, S., Parent, M.E., Siemiatycki, J., Brisson, J., 2000. Rectal cancer and occupational risk factors: a hypothesis-generating, exposure-based case-control study. *Int. J. Cancer* 87, 874–879. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20000915\)87:6<874::aid-ijc18>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000915)87:6<874::aid-ijc18>3.0.co;2-l).
- Elten, M., Benichou, E.L., Fell, D.B., Kuenzig, M.E., Smith, G., Chen, H., Kaplan, G.G., Lavigne, E., 2020. Ambient air pollution and the risk of pediatric-onset inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Environ. Int.* 138, 105676. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105676>.
- Feng, J., Cavallero, S., Hsiai, T., Li, R., 2020. Impact of air pollution on intestinal redox lipidome and microbiome. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.044>.
- Fitch, M.N., Philippidis, D., Zhang, Y., Lucero, J., Pandey, R.S., Liu, J., Brower, J., Allen, M.S., Campen, M.J., McDonald, J.D., Lund, A.K., 2020. Effects of inhaled air pollution on markers of integrity, inflammation, and microbiota profiles of the intestines in Apolipoprotein E knockout mice. *Environ. Res.* 181, 108913. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108913>.
- Fouladi, F., Bailey, M.J., Patterson, W.B., Sioda, M., Blakley, I.C., Fodor, A.A., Jones, R.B., Chen, Z., Kim, J.S., Lurmann, F., Martino, C., Knight, R., Gilliland, F.D., Alderete, T.L., 2020. Air pollution exposure is associated with the gut microbiome as revealed by shotgun metagenomic sequencing. *Environ. Int.* 138, 105604. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105604>.
- Fu, P., Bai, L., Cai, Z., Li, R., Yung, K.K.L., 2020. Fine particulate matter aggravates intestinal and brain injury and affects bacterial community structure of intestine and feces in Alzheimer's disease transgenic mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 192, 110325. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110325>.
- Gérin, M., Siemiatycki, J., Déry, M., Krewski, D., 1998. Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene, and styrene: results of a case-control study in Montreal. *Am. J. Ind. Med.* 34, 144–156. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0274\(199808\)34:2<144::AID-AJIM7>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0274(199808)34:2<144::AID-AJIM7>3.0.CO;2-X).
- Goldberg, M.S., Parent, M.-E., Siemiatycki, J., Déry, M., Nadon, L., Richardson, L., Lakhani, R., Latreille, B., Valois, M.-F., 2001. A case-control study of the relationship between the risk of colon cancer in men and exposures to occupational agents. *Am. J. Ind. Med.* 39, 531–546. <https://doi.org/10.1002/ajim.1052>.
- Gu, J., Shi, Y., Zhu, Y., Chen, N., Wang, H., Zhang, Z., Chen, T., 2020. Ambient air pollution and cause-specific risk of hospital admission in China: a nationwide time-series study. *PLoS Med.* 17, e1003188. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003188>.
- Hu, J., Bao, Y., Zhu, Y., Osman, R., Shen, M., Zhang, Z., Wang, L., Cao, S., Li, L., Wu, Q., 2020. The preliminary study on the association between PAHs and air pollutants and microbiota diversity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00757-4>.
- Kaplan, G.G., Dixon, E., Panaccione, R., Fong, A., Chen, L., Szyzkowicz, M., Wheeler, A., MacLean, A., Buie, W.D., Leung, T., Heitman, S.J., Villeneuve, P.J., 2009. Effect of ambient air pollution on the incidence of appendicitis. *CMAJ* 181, 591–597. <https://doi.org/10.1503/cmaj.082068>.
- Kaplan, G.G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B.E., Panaccione, R., Ghosh, S., Wheeler, A.J., Villeneuve, P.J., 2010. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2412–2419. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.252>.
- Kaplan, G.G., Szyzkowicz, M., Fichna, J., Rowe, B.H., Porada, E., Vincent, R., Madsen, K., Ghosh, S., Storr, M., 2012. Non-specific abdominal pain and air pollution: a novel association. *PLoS One* 7, e47669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047669>.
- Kaplan, G.G., Tanyingoh, D., Dixon, E., Johnson, M., Wheeler, A.J., Myers, R.P., Bertazon, S., Saini, V., Madsen, K., Ghosh, S., Villeneuve, P.J., 2013. Ambient ozone concentrations and the risk of perforated and nonperforated appendicitis: a multicity case-control study. *Environ. Health Perspect.* 121, 939–943. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206085>.
- Karagulian, F., Bellis, C.A., Dora, C.F.C., Prüss-Ustün, A.M., Bonjour, S., Adair-Rohani, H., Amann, M., 2015. Contributions to cities' ambient particulate matter (PM): a systematic review of local source contributions at global level. *Atmos. Environ.* 120, 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.08.087>.
- Kundu, S., Stone, E.A., 2014. Composition and sources of fine particulate matter across urban and rural sites in the Midwestern United States. *Environ. Sci. Process Impacts* 16, 1360–1370. <https://doi.org/10.1039/C3EM00719G>.
- Labiris, N.R., Dolovich, M.B., 2003. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56, 588–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01892.x>.
- Laharie, D., Debeugny, S., Peeters, M., Gossum, A. van, Gower-Rousseau, C., Bélaiche, J., Fiasse, R., Dupas, J.-L., Lerebours, E., Pottie, S., Cortot, A., Vermeire, S., Grandbastien, B., Colombel, J.-F., 2001. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 120, 816–819. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22574>.
- Lielieveld, J., Pozzer, A., Pöschl, U., Fnais, M., Haines, A., Münzel, T., 2020. Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective. *Cardiovasc. Res.* 116 (11), 1910–1917. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa025>.
- Li, R., Navab, K., Hough, G., Daher, N., Zhang, M., Mittelstein, D., Lee, K., Pakbin, P., Saffari, A., Bhetraratana, M., Sulaiman, D., Beebe, T., Wu, L., Jen, N., Wine, E., Tseng, C.-H., Araujo, J.A., Fogelman, A., Sioutas, C., Navab, M., Hsiai, T.K., 2015. Effect of exposure to atmospheric ultrafine particles on production of free fatty acids and lipid metabolites in the mouse small intestine. *Environ. Health Perspect.* 123, 34–41. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307036>.
- Li, X., Cui, J., Yang, H., Sun, H., Lu, R., Gao, N., Meng, Q., Wu, S., Wu, J., Aschner, M., Chen, R., 2019a. Colonic injuries induced by inhalational exposure to particulate-matter air pollution. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wuertt. Ger.* 6, 1900180. <https://doi.org/10.1002/adv.201900180>.
- Li, X., Sun, H., Li, B., Zhang, X., Cui, J., Yun, J., Yang, Y., Zhang, L., Meng, Q., Wu, S., Duan, J., Yang, H., Wu, J., Sun, Z., Zou, Y., Chen, R., 2019b. Probiotics ameliorate colon epithelial injury induced by ambient ultrafine particles exposure. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wuertt. Ger.* 6, 1900972. <https://doi.org/10.1002/adv.201900972>.
- Liu, T., Chen, X., Xu, Y., Wu, W., Tang, W., Chen, Z., Ji, G., Peng, J., Jiang, Q., Xiao, J., Li, X., Zeng, W., Xu, X., Hu, J., Guo, Y., Zou, F., Du, Q., Zhou, H., He, Y., Ma, W., 2019. Gut microbiota partially mediates the effects of fine particulate matter on type 2 diabetes: evidence from a population-based epidemiological study. *Environ. Int.* 130, 104882. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.076>.
- Maglione, G.A., Kurtz, M.L., Orona, N.S., Astorf, F., Brites, F., Morales, C., Berra, A., Tasat, D.R., 2020. Changes in extrapulmonary organs and serum enzyme biomarkers after chronic exposure to Buenos Aires air pollution. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 14529–14542. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07996-x>.
- Montero-Montoya, R., López-Vargas, R., Arellano-Aguilar, O., 2018. Volatile organic compounds in air: sources, distribution, exposure and associated illnesses in children. *Ann. Glob. Health* 84, 225–238. <https://doi.org/10.2902/aogh.910>.
- Mutlu, E.A., Engen, P.A., Soberanes, S., Ulrich, D., Forsyth, C.B., Nigdeliöglu, R., Chiarella, S.E., Radigan, K.A., Gonzalez, A., Jakate, S., Keshavarzian, A., Budinger, G.S., Mutlu, G.M., 2011. Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 8, 19. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-19>.
- Mutlu, E.A., Comba, I.Y., Cho, T., Engen, P.A., Yazici, C., Soberanes, S., Hamanaka, R.B., Nigdeliöglu, R., Meliton, A.Y., Chio, A.J., Budinger, G.R.S., Mutlu, G.M., 2018. Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 240, 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.130>.
- Opsteiten, J.L., Beelen, R.M.J., Leenders, M., Hoek, G., Brunekreef, B., van Schaik, F.D.M., Siersema, P.D., Eriksen, K.T., Raaschou-Nielsen, O., Tjønneland, A., Overvad, K., Boutron-Ruault, M.-C., Carbone, F., de Hoogh, K., Key, T.J., Luben, R., Chan, S.S.M., Hart, A.R., Bueno-de-Mesquita, H.B., Oldenburg, B., 2016. Exposure to ambient air pollution and the risk of inflammatory bowel disease: a European nested case-control study. *Dig. Dis. Sci.* 61, 2963–2971. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4249-4>.
- Orazzo, F., Nespoli, L., Ito, K., Tassinari, D., Giardina, D., Funis, M., Cecchi, A., Trapani, C., Forgeschi, G., Vignini, M., Nosetti, L., Pigna, S., Zanobetti, A., 2009. Air pollution, aeroallergens, and emergency room visits for acute respiratory diseases and gastroenteric disorders among young children in six Italian cities. *Environ. Health Perspect.* 117, 1780–1785. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900599>.
- Pastorekova, S., Gillies, R.J., 2019. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 38, 65–77. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09799-0>.
- Pezhman, A.N., Ali, M.S., Sadegh, L., Abdolrahim, M., Eskandar, H., Jalal, H.S., Farzad, J.Z., Elham, K.M., 2016. Role of air pollution in Inflammatory Bowel Disease Flares: A Retrospective Study. vol. 20 pp. 261–267.
- Ruder, A.M., Ward, E.M., Brown, D.P., 1994. Cancer mortality in female and male dry-cleaning workers. *J. Occup. Med. Off. Publ. Ind. Med. Assoc.* 36, 867–874.
- Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>.
- Schraufnagel, D.E., Balmes, J.R., Cowl, C.T., De Matteis, S., Jung, S.-H., Mortimer, K., Perez-Padilla, R., Rice, M.B., Riojas-Rodriguez, H., Sood, A., Thurston, G.D., To, T., Vanker, A., Wuebbles, D.J., 2019. Air pollution and noncommunicable diseases: a review by the forum of international respiratory societies' environmental committee, part 2: air pollution and organ systems. *Chest* 155, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.041>.
- Semmler-Behnke, Manuela, Takenaka, Shinji, Fertsch, Stefanie, Wenk, Alexander, Seitz, Jürgen, Mayer, Paula, Oberdörster, Günter, Kreyling, Wolfgang G., 2007. Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ. Health Perspect.* 115, 728–733. <https://doi.org/10.1289/ehp.9685>.
- Smith, J.R.H., Etherington, G., Shutt, A.L., Youngman, M.J., 2002. A study of aerosol deposition and clearance from the human nasal passage. *Ann. Occup. Hyg* 46, 309–313.
- Spinelle, L., Gerboles, M., Kok, G., Persijn, S., Sauerwald, T., 2017. Review of portable and low-cost sensors for the ambient air monitoring of benzene and other volatile organic compounds. *Sensors* 17, 1520. <https://doi.org/10.3390/s17071520>.
- Talibov, M., Sormunen, J., Hansen, J., Kjaerheim, K., Martinsen, J.-L., Sparen, P., Tryggvadottir, L., Weiderpass, E., Pukkala, E., 2018. Benzene exposure at workplace and risk of colorectal cancer in four Nordic countries. *Cancer Epidemiol.* 55, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.06.011>.
- Tan, T.-K., Saps, M., Lin, C.-L., Wei, C.-C., 2019. Is long-term ambient air pollutant exposure a risk factor for irritable bowel syndrome in children? A 12-year longitudinal cohort study. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 25, 241–249. <https://doi.org/10.5056/jnm18135>.
- Tsai, S.-S., Chiu, H.-F., Yang, C.-Y., 2019. Ambient air pollution and hospital admissions for peptic ulcers in Taipei: a time-stratified case-control study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111916>.



## ARTICLE IN PRESS

C. Vignal, E. Guilloteau, C. Gower-Rousseau et al.

*Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx*

- US EPA, O, 2014. Technical Overview of Volatile Organic Compounds [WWW Document]. US EPA URL. <https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/technical-overview-volatile-organic-compounds>. (Accessed 4 August 2020).
- Vignal, C., Pichavant, M., Alleman, L.Y., Djouina, M., Dingreville, F., Perdrix, E., Waxin, C., Ouali Alami, A., Gower-Rousseau, C., Desreumaux, P., Body-Malapel, M., 2017. Effects of urban coarse particles inhalation on oxidative and inflammatory parameters in the mouse lung and colon. *Part. Fibre Toxicol.* 14, 46. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0227-z>.
- Vincent, R., Bjarnason, S.G., Adamson, I.Y., Hedgecock, C., Kumarathasan, P., Guénette, J., Potvin, M., Goegan, P., Bouthillier, L., 1997. Acute pulmonary toxicity of urban particulate matter and ozone. *Am. J. Pathol.* 151, 1563.
- Wang, W., Zhou, J., Chen, M., Huang, X., Xie, X., Li, W., Cao, Q., Kan, H., Xu, Y., Ying, Z., 2018. Exposure to concentrated ambient PM<sub>2.5</sub> alters the composition of gut microbiota in a murine model. *Part. Fibre Toxicol.* 15, 17. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0252-6>.
- WHO, 2020. Ambient Air Pollution: A Global Assessment of Exposure and Burden of Disease [WWW Document]. WHO <http://www.who.int/phe/publications/air-pollution-global-assessment/en/> accessed 4.22.20.
- Xu, C., Kan, H.-D., Fan, Y.-N., Chen, R.-J., Liu, J.-H., Li, Y.-F., Zhang, Y., Ji, A.-L., Cai, T.-J., 2016. Acute effects of air pollution on enteritis admissions in Xi'an, China. *J. Toxicol. Environ. Health A* 79, 1183–1189. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1227006>.
- Yin, Fen, Lawal, Akeem, Ricks, Jerry, Fox, Julie R., Larson, Tim, Navab, Mohamad, Fogelman, Alan M., Rosenfeld, Michael E., Araujo, Jesus A., 2013. Diesel exhaust induces systemic lipid peroxidation and development of dysfunctional pro-oxidant and pro-inflammatory high-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1153–1161. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300552>.



## ANNEXE

# Liste des Valeurs guides de qualité d'air intérieur de l'Anses

L'Agence mène une mission pérenne d'expertise relative à l'élaboration de valeurs guides de qualité d'air intérieur (VGAI) menée depuis 2004.

- Voir notre article sur les valeurs guides de qualité d'air intérieur

Substances	Année de parution	Type de valeurs	VGAI	Méthodes de mesure recommandées
Acétaldéhyde	2014	VGAI court terme : pour une exposition de 1 heure	3 000 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement par pompage sur un support imprégné, une désorption solvant et une analyse par chromatographie liquide avec détecteur UV/visible
		VGAI long terme : pour une exposition > 1 an	160 µg.m <sup>-3</sup>	Aucune méthode de mesure recommandée car nécessité de développement et de validation
Acide cyanhydrique (HCN)	2011	pas de VGAI court terme proposée	/	/
Acroléine	2013	VGAI court terme : pour une exposition de 1 heure	6,9 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement par canister avec une préconcentration et une analyse par chromatographie en phase gazeuse et détection par spectrométrie de masse
		VGAI long terme : pour une exposition > 1 an	0,8 µg.m <sup>-3</sup>	Aucune méthode de mesure recommandée car nécessité de développement et de validation
Ammoniac (NH <sub>3</sub> )	2021	VGAI court terme : pour une exposition de 24 heures	5 900 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement actif sur support (filtre ou tube) imprégné, désorption dans de l'eau ou H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> suivie d'une analyse par chromatographie ionique
		VGAI long terme : pour une exposition > 1 an	500 µg.m <sup>-3</sup>	
Benzène	2008	VGAI court terme : pour une exposition de 1 à 14 jours	30 µg.m <sup>-3</sup>	/
		VGAI intermédiaire : pour une exposition de 14 jours à 1 an	20 µg.m <sup>-3</sup>	
		VGAI long terme : pour une exposition > 1 an	10 µg.m <sup>-3</sup>	
		VGAI long terme : pour une exposition vie entière correspondant à un niveau de risque de 10 <sup>-6</sup>	0,2 µg.m <sup>-3</sup>	
		VGAI long terme : pour une exposition vie entière correspondant à un niveau de risque de 10 <sup>-5</sup>	2 µg.m <sup>-3</sup>	
Dioxyde d'azote (NO <sub>2</sub> )	2013	VGAI court terme : pour une exposition de 1 heure	200 µg.m <sup>-3</sup>	Méthode de mesure directe par chimiluminescence Prélèvement par pompage sur support imprégné et analyse par spectrophotométrie ou chromatographie ionique
		VGAI long terme : pour une exposition > 1 an	20 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement par diffusion passive et analyse par spectrophotométrie ou chromatographie ionique
Ethylbenzène	2016	VGAI court terme : pour une exposition de 24 heures	22 000 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement actif sur tube adsorbant, désorption solvant et analyse par chromatographie gazeuse et détection à ionisation de flamme
		VGAI long terme : pour une exposition > 1 an	1 500 µg.m <sup>-3</sup>	
Formaldéhyde	Mise à jour en 2018	VGAI court terme <b>A respecter de manière répétée et continue pour toute la journée</b>	100 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement actif sur tube de gel de silice imprégné de DNPH – Dosage par chromatographie en phase liquide détecteur UV/visible ou Prélèvement passif sur badge imprégné de DNPH/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (cartouche DSD-DNPH) – dosage par chromatographie en phase liquide avec détecteur UV/visible

Substances	Année de parution	Type de valeurs	VGAI	Méthodes de mesure recommandées
Monoxyde de carbone (CO)	2007	VGAI court terme - Pour une exposition de 8 heures - Pour une exposition de 1 heure - Pour une exposition de 30 minutes Pour une exposition de 15 minutes	10 mg.m <sup>-3</sup> 30 mg.m <sup>-3</sup> 60 mg.m <sup>-3</sup> 100 mg.m <sup>-3</sup>	/
Naphtalène	2009	VGAI long terme : pour une exposition > 1 an	10 µg.m <sup>-3</sup>	/
Particules* (PM <sub>2,5</sub> et PM <sub>10</sub> )	2010	pas de VGAI proposées	/	/
Trichloroéthylène	Mise à jour en 2019	VGAI intermédiaire : pour une exposition de 14 jours à 1 an	3200 µg.m <sup>-3</sup>	**
		VGAI long terme : pour une exposition vie entière correspondant à un niveau de risque de 10 <sup>-6</sup>	1 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement <u>actif</u> ou <u>par diffusion passive</u> sur tube avec une désorption thermique suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse et détection par à ionisation de flamme ou spectrométrie de masse Prélèvement par canister avec une préconcentration et une analyse par chromatographie en phase gazeuse et détection par spectrométrie de masse
		VGAI long terme : pour une exposition vie entière correspondant à un niveau de risque de 10 <sup>-5</sup>	10 µg.m <sup>-3</sup>	
Tétrachloroéthylène	2010	VGAI court terme : pour une exposition de 1 à 14 jours	1380 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement actif par pompage sur tube de charbon actif avec une désorption au disulfure de carbone et une analyse CPG/DIF ou CPG/SM
		VGAI long terme : pour une exposition > 1 an	250 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement par diffusion passive sur tube contenant du charbon actif avec une désorption au disulfure de carbone suivie d'une analyse par CPG/DIF ou CPG/SM
Toluène	2018	VGAI <b>A respecter pour une mesure sur le court terme ou le long terme</b>	20 000 µg.m <sup>-3</sup>	Prélèvement actif sur tube adsorbant, désorption solvant et analyse, en chromatographie en phase gazeuse couplée soit à un détecteur à ionisation de flamme, soit à un spectromètre de masse avec ou sans mode d'injection par Head space

\* Pour les particules présentes dans l'air intérieur, l'Anses ne propose pas de VGAI pour des expositions aiguës et chroniques mais elle recommande la mise en œuvre, par les politiques publiques, des valeurs guides de l'OMS pour l'amélioration de la qualité de l'air intérieur :

- Sur 24 heures : 25 µg.m<sup>-3</sup> pour les PM<sub>2.5</sub> et 50 µg.m<sup>-3</sup> pour les PM<sub>10</sub>
- Sur le long terme : 10 µg.m<sup>-3</sup> pour les PM<sub>2.5</sub> et 20 µg.m<sup>-3</sup> pour les PM<sub>10</sub>

\*\* Méthodes mieux adaptées : prélèvement actif ou par diffusion passive sur tube avec une désorption solvant suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse et détection par à ionisation de flamme

Date de mise à jour : Juillet 2020

# PARTIE V - BIBLIOGRAPHIE

1. Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol.* 2017;10(2):299-306.
2. Bailey MJ, Naik NN, Wild LE, Patterson WB, Alderete TL. Exposure to air pollutants and the gut microbiota: a potential link between exposure, obesity, and type 2 diabetes. *Gut Microbes.* 2020;11(5):1188-202.
3. Clarke G, Sandhu KV, Griffin BT, Dinan TG, Cryan JF, Hyland NP. Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic-Microbiome Interactions. *Pharmacol Rev.* 2019;71(2):198-224.
4. Foss Hansen S, Heggelund LR, Revilla Besora P, Mackevica A, Boldrin A, Baun A. Nanoproducts – what is actually available to European consumers? *Environmental Science: Nano.* 2016;3(1):169-80.
5. O'Dwyer DN, Dickson RP, Moore BB. The Lung Microbiome, Immunity, and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease. *J Immunol.* 2016;196(12):4839-47.
6. Sommer F, Ruhlemann MC, Bang C, Hoppner M, Rehman A, Kaleta C, et al. Microbiomarkers in inflammatory bowel diseases: caveats come with caviar. *Gut.* 2017;66(10):1734-8.
7. Ji Z, Guo W, Sakkiah S, Liu J, Patterson TA, Hong H. Nanomaterial Databases: Data Sources for Promoting Design and Risk Assessment of Nanomaterials. *Nanomaterials (Basel).* 2021;11(6).
8. Wong AC, Vanhove AS, Watnick PI. The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Dis Model Mech.* 2016;9(3):271-81.
9. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(10):667-85.
10. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet.* 2007;369(9573):1627-40.
11. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet.* 2012;380(9853):1590-605.
12. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:573-621.
13. Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2017;152(2):313-21 e2.
14. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):39-49.
15. Bequet E, Sarter H, Fumery M, Vasseur F, Armengol-Debeir L, Pariente B, et al. Incidence and Phenotype at Diagnosis of Very-early-onset Compared with Later-onset Paediatric Inflammatory Bowel Disease: A Population-based Study [1988-2011]. *J Crohns Colitis.* 2017;11(5):519-26.
16. Ananthakrishnan AN, McGinley EL, Binion DG, Saeian K. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(5):1138-45.
17. Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J, Sands BE, Panaccione R, Ghosh S, et al. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(11):2412-9.
18. Bell ML, Davis DL, Fletcher T. A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environ Health Perspect.* 2004;112(1):6-8.
19. Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *J Med Toxicol.* 2012;8(2):166-75.
20. Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health.* 2008;23(4):243-97.
21. Vignal C, Pichavant M, Alleman LY, Djouina M, Dingreville F, Perdrix E, et al. Effects of urban coarse particles inhalation on oxidative and inflammatory parameters in the mouse lung and colon. *Part Fibre Toxicol.* 2017;14(1):46.

22. Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec.* 2001;262(1):125-35.
23. Sanders KM, Kito Y, Hwang SJ, Ward SM. Regulation of Gastrointestinal Smooth Muscle Function by Interstitial Cells. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(5):316-26.
24. Stedman A, Nigro G, Sansonetti PJ. [Microbiota-intestinal stem cells dialog: a key element for intestinal regeneration]. *Med Sci (Paris).* 2016;32(11):983-90.
25. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(6):411-20.
26. Koslowski MJ, Beisner J, Stange EF, Wehkamp J. Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(1):34-40.
27. Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(5):G851-7.
28. Shen W, Li S, Chung SH, Zhu L, Stayt J, Su T, et al. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and claudin-5 is associated with TGF-beta1-induced permeability of centrally derived vascular endothelium. *Eur J Cell Biol.* 2011;90(4):323-32.
29. Bansal T, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):228-33.
30. Camilleri M, Lasch K, Zhou W. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(7):G775-85.
31. Johansson ME, Sjoval H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(6):352-61.
32. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(2):75-85.
33. Sigurdsson HH, Kirch J, Lehr CM. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Int J Pharm.* 2013;453(1):56-64.
34. Corazzari ES. Intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48 Suppl 2:S54-5.
35. Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(2):158-71.
36. Demouveau B, Gouyer V, Gottrand F, Narita T, Desseyn JL. Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Adv Colloid Interface Sci.* 2018;252:69-82.
37. Hapfelmeier S, Lawson MA, Slack E, Kirundi JK, Stoel M, Heikenwalder M, et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science.* 2010;328(5986):1705-9.
38. Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe.* 2007;2(5):328-39.
39. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):159-69.
40. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(7):503-16.
41. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol.* 2009;70(6):505-15.
42. Belkaid Y, Naik S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. *Nat Immunol.* 2013;14(7):646-53.
43. Shan M, Gentile M, Yeiser JR, Walland AC, Bornstein VU, Chen K, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science.* 2013;342(6157):447-53.
44. Wright PF. Inductive/effector mechanisms for humoral immunity at mucosal sites. *Am J Reprod Immunol.* 2011;65(3):248-52.

45. Taylor BC, Zaph C, Troy AE, Du Y, Guild KJ, Comeau MR, et al. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med*. 2009;206(3):655-67.
46. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*. 2014;15(10):929-37.
47. Begue B, Verdier J, Rieux-Laucat F, Goulet O, Morali A, Canioni D, et al. Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(8):1544-55.
48. Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zanker M, Arbach O, et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity*. 2014;40(4):582-93.
49. Zindl CL, Lai JF, Lee YK, Maynard CL, Harbour SN, Ouyang W, et al. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(31):12768-73.
50. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*. 2015;21(7):698-708.
51. Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y, et al. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science*. 2014;343(6178):1249288.
52. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy S, Berard M, Kleinschek M, et al. RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol*. 2011;12(4):320-6.
53. Bekiaris V, Persson EK, Agace WW. Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. *Immunol Rev*. 2014;260(1):86-101.
54. Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(10):735-44.
55. Bouskra D, Brezillon C, Berard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*. 2008;456(7221):507-10.
56. Lecuyer E, Rakotobe S, Lengline-Garnier H, Lebreton C, Picard M, Juste C, et al. Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity*. 2014;40(4):608-20.
57. Slack E, Balmer ML, Macpherson AJ. B cells as a critical node in the microbiota-host immune system network. *Immunol Rev*. 2014;260(1):50-66.
58. Cypowyj S, Picard C, Marodi L, Casanova JL, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol*. 2012;42(9):2246-54.
59. Cao AT, Yao S, Gong B, Elson CO, Cong Y. Th17 cells upregulate polymeric Ig receptor and intestinal IgA and contribute to intestinal homeostasis. *J Immunol*. 2012;189(9):4666-73.
60. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA, Ng DC, Slack E, Hapfelmeier S, et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*. 2011;34(5):794-806.
61. Wang M, Gao Z, Zhang Z, Pan L, Zhang Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(12):3544-51.
62. Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflam*. 2010;2010:823710.
63. Heel KA, McCauley RD, Papadimitriou JM, Hall JC. Review: Peyer's patches. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12(2):122-36.
64. Azegami T, Yuki Y, Kiyono H. Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *Int Immunol*. 2014;26(9):517-28.
65. Philpott DJ, Girardin SE, Sansonetti PJ. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(4):410-6.
66. Nowarski R, Jackson R, Flavell RA. The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier. *Cell*. 2017;168(3):362-75.



67. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001;2(4):361-7.
68. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 2008;1(1):11-22.
69. Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* 2005;206:32-63.
70. Sutherland DB, Suzuki K, Fagarasan S. Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. *Immunol Rev.* 2016;270(1):20-31.
71. Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, et al. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity.* 2014;41(1):152-65.
72. Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, Barry NA, Stefanowski J, Hao L, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell.* 2014;158(5):1000-10.
73. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(4):244-53.
74. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006;124(4):837-48.
75. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005;308(5728):1635-8.
76. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533.
77. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7(5):335-6.
78. Young VB, Schmidt TM. Overview of the gastrointestinal microbiota. *Adv Exp Med Biol.* 2008;635:29-40.
79. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
80. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Vannucci L, Tuckova L, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* 2011;8(2):110-20.
81. Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One.* 2013;8(6):e66019.
82. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med.* 2009;1(6):6ra14.
83. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(34):13780-5.
84. Kobozev I, Reinoso Webb C, Furr KL, Grisham MB. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2014;68:122-33.
85. Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrom K, Rajilic M, Vaughan EE, de Vos WM, et al. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):4153-5.
86. Voreades N, Kozil A, Weir TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol.* 2014;5:494.
87. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2008;134(2):577-94.
88. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(1):20-32.
89. Tulic MK, Piche T, Verhasselt V. Lung-gut cross-talk: evidence, mechanisms and implications for the mucosal inflammatory diseases. *Clin Exp Allergy.* 2016;46(4):519-28.

90. Ekmekciü I, von Klitzing E, Neumann C, Bacher P, Scheffold A, Bereswill S, et al. Fecal Microbiota Transplantation, Commensal *Escherichia coli* and *Lactobacillus johnsonii* Strains Differentially Restore Intestinal and Systemic Adaptive Immune Cell Populations Following Broad-spectrum Antibiotic Treatment. *Front Microbiol.* 2017;8:2430.
91. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004;118(2):229-41.
92. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(13):5354-9.
93. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(10):577-89.
94. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31(1):69-75.
95. Wu W, Chen F, Liu Z, Cong Y. Microbiota-specific Th17 Cells: Yin and Yang in Regulation of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(6):1473-82.
96. Torow N, Hornef MW. The Neonatal Window of Opportunity: Setting the Stage for Life-Long Host-Microbial Interaction and Immune Homeostasis. *J Immunol.* 2017;198(2):557-63.
97. Donovan SM. Introduction to the special focus issue on the impact of diet on gut microbiota composition and function and future opportunities for nutritional modulation of the gut microbiome to improve human health. *Gut Microbes.* 2017;8(2):75-81.
98. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(33):14691-6.
99. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science.* 2011;334(6052):105-8.
100. Vinolo MA, Ferguson GJ, Kulkarni S, Damoulakis G, Anderson K, Bohlooly YM, et al. SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One.* 2011;6(6):e21205.
101. Ha CW, Lam YY, Holmes AJ. Mechanistic links between gut microbial community dynamics, microbial functions and metabolic health. *World J Gastroenterol.* 2014;20(44):16498-517.
102. Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients.* 2015;7(4):2839-49.
103. Yang H, Duan Z. The Local Defender and Functional Mediator: Gut Microbiome. *Digestion.* 2018;97(2):137-45.
104. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes.* 2016;7(3):189-200.
105. Gaudier E, Jarry A, Blottiere HM, de Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, et al. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287(6):G1168-74.
106. Ohata A, Usami M, Miyoshi M. Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxigenase activation. *Nutrition.* 2005;21(7-8):838-47.
107. Jung TH, Park JH, Jeon WM, Han KS. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutr Res Pract.* 2015;9(4):343-9.
108. Jimenez JA, Uwiera TC, Abbott DW, Uwiera RRE, Inglis GD. Butyrate Supplementation at High Concentrations Alters Enteric Bacterial Communities and Reduces Intestinal Inflammation in Mice Infected with *Citrobacter rodentium*. *mSphere.* 2017;2(4).
109. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 2011;469(7331):543-7.
110. Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology.* 2013;145(2):396-406 e1-10.

111. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell*. 2012;48(4):612-26.
112. Chauvistre H, Kustermann C, Rehage N, Klisch T, Mitzka S, Felker P, et al. Dendritic cell development requires histone deacetylase activity. *Eur J Immunol*. 2014;44(8):2478-88.
113. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504(7480):451-5.
114. Budden KF, Gellatly SL, Wood DL, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(1):55-63.
115. Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2017;14(10):573-84.
116. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 2007;317(5835):256-60.
117. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(27):12204-9.
118. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(10):577-91.
119. Nanda K, Moss AC. Update on the management of ulcerative colitis: treatment and maintenance approaches focused on MMX((R)) mesalamine. *Clin Pharmacol*. 2012;4:41-50.
120. Habens F, Srinivasan N, Oakley F, Mann DA, Ganesan A, Packham G. Novel sulfasalazine analogues with enhanced NF- $\kappa$ B inhibitory and apoptosis promoting activity. *Apoptosis*. 2005;10(3):481-91.
121. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55(2):205-11.
122. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16731-6.
123. Luo A, Leach ST, Barres R, Hesson LB, Grimm MC, Simar D. The Microbiota and Epigenetic Regulation of T Helper 17/Regulatory T Cells: In Search of a Balanced Immune System. *Front Immunol*. 2017;8:417.
124. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Verstraelen H, Osowska S, Doerffel Y. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology*. 2008;135(2):568-79.
125. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Nunez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):321-35.
126. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500(7464):541-6.
127. Macdermott RP, Green JA. Refractory ulcerative colitis treatment. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2007;3(1):64-9.
128. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:22.
129. Serino M, Blasco-Baque V, Nicolas S, Burcelin R. Far from the eyes, close to the heart: dysbiosis of gut microbiota and cardiovascular consequences. *Curr Cardiol Rep*. 2014;16(11):540.
130. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 1999;67(9):4499-509.
131. Dharmani P, Strauss J, Ambrose C, Allen-Vercoe E, Chadee K. *Fusobacterium nucleatum* infection of colonic cells stimulates MUC2 mucin and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*. 2011;79(7):2597-607.

132. Zeller G, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol.* 2014;10:766.
133. Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology.* 2014;147(5):1055-63 e8.
134. Glover LE, Lee JS, Colgan SP. Oxygen metabolism and barrier regulation in the intestinal mucosa. *J Clin Invest.* 2016;126(10):3680-8.
135. Lopez CA, Miller BM, Rivera-Chavez F, Velazquez EM, Byndloss MX, Chavez-Arroyo A, et al. Virulence factors enhance *Citrobacter rodentium* expansion through aerobic respiration. *Science.* 2016;353(6305):1249-53.
136. Winter SE, Lopez CA, Baumler AJ. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Rep.* 2013;14(4):319-27.
137. Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM, Lee D, et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host Microbe.* 2015;18(4):489-500.
138. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyotylainen T, Hamalainen AM, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe.* 2015;17(2):260-73.
139. Huttenhower C, Kostic AD, Xavier RJ. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity.* 2014;40(6):843-54.
140. Casen C, Vebo HC, Sekelja M, Hegge FT, Karlsson MK, Ciemniejewska E, et al. Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(1):71-83.
141. Wright EK, Kamm MA, Teo SM, Inouye M, Wagner J, Kirkwood CD. Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(6):1219-28.
142. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature.* 2013;500(7461):232-6.
143. Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* 2011;11:7.
144. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res.* 2007;6(2):546-51.
145. Zhang M, Liu B, Zhang Y, Wei H, Lei Y, Zhao L. Structural shifts of mucosa-associated lactobacilli and *Clostridium leptum* subgroup in patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):496-500.
146. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):131-44.
147. Asquith M, Powrie F. An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer. *J Exp Med.* 2010;207(8):1573-7.
148. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(9):1583-97.
149. Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol.* 2004;41(11):1099-108.
150. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16(1):3-9.
151. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):371-82.
152. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2004;126(4):1054-70.

153. Price AE, Shamardani K, Lugo KA, Deguine J, Roberts AW, Lee BL, et al. A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns. *Immunity*. 2018;49(3):560-75 e6.
154. Carvalho FA, Koren O, Goodrich JK, Johansson ME, Nalbantoglu I, Aitken JD, et al. Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell Host Microbe*. 2012;12(2):139-52.
155. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010;328(5975):228-31.
156. Ubeda C, Lipuma L, Gobourne A, Viale A, Leiner I, Equinda M, et al. Familial transmission rather than defective innate immunity shapes the distinct intestinal microbiota of TLR-deficient mice. *J Exp Med*. 2012;209(8):1445-56.
157. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*. 2008;453(7195):620-5.
158. Lee YK, Mehrabian P, Boyajian S, Wu WL, Selicha J, Vonderfecht S, et al. The Protective Role of *Bacteroides fragilis* in a Murine Model of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *mSphere*. 2018;3(6).
159. Ramakrishna C, Kujawski M, Chu H, Li L, Mazmanian SK, Cantin EM. *Bacteroides fragilis* polysaccharide A induces IL-10 secreting B and T cells that prevent viral encephalitis. *Nat Commun*. 2019;10(1):2153.
160. Erturk-Hasdemir D, Oh SF, Okan NA, Stefanetti G, Gazzaniga FS, Seeberger PH, et al. Symbionts exploit complex signaling to educate the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019.
161. Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, et al. Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing Lactobacillus-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine. *Cell Host Microbe*. 2015;18(2):183-97.
162. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*. 2001;167(4):1882-5.
163. Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A, Normark S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2003;198(8):1225-35.
164. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20858-63.
165. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 2004;5(11):1166-74.
166. Ramanan D, Tang MS, Bowcutt R, Loke P, Cadwell K. Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal *Bacteroides vulgatus*. *Immunity*. 2014;41(2):311-24.
167. Nigro G, Rossi R, Commere PH, Jay P, Sansonetti PJ. The cytosolic bacterial peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut epithelial regeneration. *Cell Host Microbe*. 2014;15(6):792-8.
168. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(1):9-20.
169. Chen GY, Shaw MH, Redondo G, Nunez G. The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. *Cancer Res*. 2008;68(24):10060-7.
170. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):407-20.
171. Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, Bergstrom KS, McIntire CR, LeBlanc PM, et al. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*. 2010;32(3):367-78.

172. Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity*. 2010;32(3):379-91.
173. Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*. 2010;207(5):1045-56.
174. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011;145(5):745-57.
175. Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, Dohnalova L, Zilberman-Schapira G, Mahdi JA, et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell*. 2015;163(6):1428-43.
176. Wlodarska M, Thaiss CA, Nowarski R, Henao-Mejia J, Zhang JP, Brown EM, et al. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell*. 2014;156(5):1045-59.
177. Birchenough GM, Nystrom EE, Johansson ME, Hansson GC. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science*. 2016;352(6293):1535-42.
178. Siegmund B. Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe? *Immunity*. 2010;32(3):300-2.
179. Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai RM, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med*. 2010;207(8):1625-36.
180. Ng J, Hirota SA, Gross O, Li Y, Ulke-Lemee A, Potentier MS, et al. Clostridium difficile toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology*. 2010;139(2):542-52, 52 e1-3.
181. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2001;121(3):580-91.
182. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*. 2004;127(1):224-38.
183. Kojima K, Musch MW, Ren H, Boone DL, Hendrickson BA, Ma A, et al. Enteric flora and lymphocyte-derived cytokines determine expression of heat shock proteins in mouse colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1395-407.
184. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol*. 2004;5(1):104-12.
185. Wolf AJ, Underhill DM. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(4):243-54.
186. Ratsimandresy RA, Indramohan M, Dorfleutner A, Stehlik C. The AIM2 inflammasome is a central regulator of intestinal homeostasis through the IL-18/IL-22/STAT3 pathway. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(1):127-42.
187. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol*. 2006;7(6):576-82.
188. Saleh M, Trinchieri G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):9-20.
189. Hill DA, Artis D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:623-67.
190. Melmed GY, Targan SR. Future biologic targets for IBD: potentials and pitfalls. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(2):110-7.
191. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2269-80.

192. Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ, et al. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity*. 2010;33(2):279-88.
193. Leppkes M, Becker C, Ivanov, II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, et al. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology*. 2009;136(1):257-67.
194. Maloy KJ, Kullberg MC. IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2008;1(5):339-49.
195. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*. 2008;205(5):1063-75.
196. Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139(3):485-98.
197. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*. 2009;31(4):677-89.
198. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol*. 2010;32(1):17-31.
199. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med*. 2009;206(7):1465-72.
200. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):435-46.
201. Varol C, Zigmund E, Jung S. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):415-26.
202. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*. 2009;31(3):513-25.
203. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med*. 2009;206(13):3101-14.
204. Laffont S, Siddiqui KR, Powrie F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1877-83.
205. Niess JH, Adler G. Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *J Immunol*. 2010;184(4):2026-37.
206. Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol*. 2011;4(1):31-42.
207. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*. 2009;10(11):1178-84.
208. Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*. 2009;31(3):502-12.
209. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:313-38.
210. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011;331(6015):337-41.
211. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010;140(6):845-58.
212. Omenetti S, Bussi C, Metidji A, Iseppon A, Lee S, Tolaini M, et al. The Intestine Harbors Functionally Distinct Homeostatic Tissue-Resident and Inflammatory Th17 Cells. *Immunity*. 2019;51(1):77-89 e6.
213. Dutzan N, Abusleme L, Bridgeman H, Greenwell-Wild T, Zangerle-Murray T, Fife ME, et al. Ongoing Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity*. 2017;46(1):133-47.

214. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*. 2009;326(5955):986-91.
215. Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, et al. Decrease of Foxp3<sup>+</sup> Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity*. 2009;31(5):772-86.
216. Bedoui S, Heath WR, Mueller SN. CD4(+) T-cell help amplifies innate signals for primary CD8(+) T-cell immunity. *Immunol Rev*. 2016;272(1):52-64.
217. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-42.
218. Kawamoto S, Tran TH, Maruya M, Suzuki K, Doi Y, Tsutsui Y, et al. The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science*. 2012;336(6080):485-9.
219. Proietti M, Cornacchione V, Rezzonico Jost T, Romagnani A, Faliti CE, Perruzza L, et al. ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism. *Immunity*. 2014;41(5):789-801.
220. Kubinak JL, Petersen C, Stephens WZ, Soto R, Bake E, O'Connell RM, et al. MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell Host Microbe*. 2015;17(2):153-63.
221. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*. 2008;28(4):468-76.
222. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Sarra M, Stolfi C, et al. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology*. 2009;136(4):1308-16, e1-3.
223. Cong Y, Feng T, Fujihashi K, Schoeb TR, Elson CO. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(46):19256-61.
224. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2009;458(7234):78-82.
225. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-81.
226. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):521-33.
227. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005;307(5717):1920-5.
228. Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol*. 2004;25(11):570-7.
229. Campbell DJ, Kim CH, Butcher EC. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev*. 2003;195:58-71.
230. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol*. 2001;2(11):997-1003.
231. Salim SY, Kaplan GG, Madsen KL. Air pollution effects on the gut microbiota: a link between exposure and inflammatory disease. *Gut Microbes*. 2014;5(2):215-9.
232. Lelieveld J, Pozzer A, Poschl U, Fnais M, Haines A, Munzel T. Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective. *Cardiovasc Res*. 2020;116(11):1910-7.
233. Vignal C, Guilloteau E, Gower-Rousseau C, Body-Malapel M. Review article: Epidemiological and animal evidence for the role of air pollution in intestinal diseases. *Sci Total Environ*. 2021;757:143718.
234. Alemayehu YA, Asfaw SL, Terfie TA. Exposure to urban particulate matter and its association with human health risks. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(22):27491-506.
235. Salim SY, Jovel J, Wine E, Kaplan GG, Vincent R, Thiesen A, et al. Exposure to ingested airborne pollutant particulate matter increases mucosal exposure to bacteria and induces early onset of inflammation in neonatal IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(7):1129-38.



236. Vincent R, Bjarnason SG, Adamson IY, Hedgecock C, Kumarathasan P, Guenette J, et al. Acute pulmonary toxicity of urban particulate matter and ozone. *Am J Pathol.* 1997;151(6):1563-70.
237. Bhalla DK. Ozone-Induced Lung Inflammation and Mucosal Barrier Disruption: Toxicology, Mechanisms, and Implications. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B.* 1999;2(1):31-86.
238. Karagulian F, Belis CA, Dora CFC, Prüss-Ustün AM, Bonjour S, Adair-Rohani H, et al. Contributions to cities' ambient particulate matter (PM): A systematic review of local source contributions at global level. *Atmospheric Environment.* 2015;120:475-83.
239. Cincinelli A, Martellini T. Indoor Air Quality and Health. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(11).
240. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007;2(4):MR17-71.
241. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):823-39.
242. Prajitha N, Athira SS, Mohanan PV. Bio-interactions and risks of engineered nanoparticles. *Environ Res.* 2019;172:98-108.
243. Rudramurthy GR, Swamy MK. Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update. *J Biol Inorg Chem.* 2018;23(8):1185-204.
244. Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol.* 2012;24(2):125-35.
245. Malakar A, Kanel SR, Ray C, Snow DD, Nadagouda MN. Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: A review. *Sci Total Environ.* 2021;759:143470.
246. Bakand S, Hayes A. Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6).
247. Li R, Navab K, Hough G, Daher N, Zhang M, Mittelstein D, et al. Effect of exposure to atmospheric ultrafine particles on production of free fatty acids and lipid metabolites in the mouse small intestine. *Environ Health Perspect.* 2015;123(1):34-41.
248. Li X, Sun H, Li B, Zhang X, Cui J, Yun J, et al. Probiotics Ameliorate Colon Epithelial Injury Induced by Ambient Ultrafine Particles Exposure. *Adv Sci (Weinh).* 2019;6(18):1900972.
249. Murugadoss S, Lison D, Godderis L, Van Den Brule S, Mast J, Brassinne F, et al. Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Arch Toxicol.* 2017;91(9):2967-3010.
250. Kim YS, Chung YH, Seo DS, Choi HS, Lim CH. Twenty-Eight-Day Repeated Inhalation Toxicity Study of Aluminum Oxide Nanoparticles in Male Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Res.* 2018;34(4):343-54.
251. Hadrup N, Sharma AK, Loeschner K, Jacobsen NR. Pulmonary toxicity of silver vapours, nanoparticles and fine dusts: A review. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2020;115:104690.
252. Srivastava V, Gusain D, Sharma YC. Critical Review on the Toxicity of Some Widely Used Engineered Nanoparticles. *Industrial & Engineering Chemistry Research.* 2015;54(24):6209-33.
253. Sahu SC, Hayes AW. Toxicity of nanomaterials found in human environment. *Toxicology Research and Application.* 2017;1.
254. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int.* 2013;2013:942916.
255. Jain AK, Senapati VA, Singh D, Dubey K, Maurya R, Pandey AK. Impact of anatase titanium dioxide nanoparticles on mutagenic and genotoxic response in Chinese hamster lung fibroblast cells (V-79): The role of cellular uptake. *Food Chem Toxicol.* 2017;105:127-39.
256. Bourikas K, Kordulis C, Lycourghiotis A. Titanium dioxide (anatase and rutile): surface chemistry, liquid-solid interface chemistry, and scientific synthesis of supported catalysts. *Chem Rev.* 2014;114(19):9754-823.
257. Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 2009;69(22):8784-9.
258. Chouirfa H, Bouloussa H, Migonney V, Falentin-Daudre C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomater.* 2019;83:37-54.

259. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:2555-62.
260. Pereira LC, Pazin M, Franco-Bernardes MF, Martins ADC, Jr., Barcelos GRM, Pereira MC, et al. A perspective of mitochondrial dysfunction in rats treated with silver and titanium nanoparticles (AgNPs and TiNPs). *J Trace Elem Med Biol*. 2018;47:63-9.
261. Lee SH, Jun BH. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4).
262. Rogers KR, Navratilova J, Stefaniak A, Bowers L, Knepp AK, Al-Abed SR, et al. Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. *Sci Total Environ*. 2018;619-620:1375-84.
263. Tang S, Zheng J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(13):e1701503.
264. Sengul AB, Asmatulu E. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2020;18(5):1659-83.
265. Guo C, Buckley A, Marczylo T, Seiffert J, Romer I, Warren J, et al. The small airway epithelium as a target for the adverse pulmonary effects of silver nanoparticle inhalation. *Nanotoxicology*. 2018;12(6):539-53.
266. Nemmar A, Yuvaraju P, Beegam S, Yasin J, Kazzam EE, Ali BH. Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in multiple organs of mice acutely exposed to amorphous silica nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:919-28.
267. Zhang Y, Lin Y, Li X, Zhang L, Pan W, Zhu H, et al. Silica dioxide nanoparticles combined with cold exposure induce stronger systemic inflammatory response. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(1):291-8.
268. Yang M, Jing L, Wang J, Yu Y, Cao L, Zhang L, et al. Macrophages participate in local and systemic inflammation induced by amorphous silica nanoparticles through intratracheal instillation. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:6217-28.
269. Ferdous Z, Nemmar A. Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7).
270. De Matteis V. Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation. *Toxics*. 2017;5(4).
271. Koulova A, Frishman WH. Air pollution exposure as a risk factor for cardiovascular disease morbidity and mortality. *Cardiol Rev*. 2014;22(1):30-6.
272. Claeys MJ, Rajagopalan S, Nawrot TS, Brook RD. Climate and environmental triggers of acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2017;38(13):955-60.
273. Andersen ZJ, Hvidberg M, Jensen SS, Ketzel M, Loft S, Sorensen M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and long-term exposure to traffic-related air pollution: a cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(4):455-61.
274. Moulton PV, Yang W. Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *J Environ Public Health*. 2012;2012:472751.
275. Volk HE, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I, McConnell R. Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry*. 2013;70(1):71-7.
276. Hogg JC, van Eeden S. Pulmonary and systemic response to atmospheric pollution. *Respirology*. 2009;14(3):336-46.
277. van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):826-30.
278. Franklin BA, Brook R, Arden Pope C, 3rd. Air pollution and cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol*. 2015;40(5):207-38.
279. Lee WH, Choo JY, Son JY, Kim H. Association between long-term exposure to air pollutants and prevalence of cardiovascular disease in 108 South Korean communities in 2008-2010: A cross-sectional study. *Sci Total Environ*. 2016;565:271-8.

280. Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, et al. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2014;122(9):906-11.
281. Mutlu EA, Comba IY, Cho T, Engen PA, Yazici C, Soberanes S, et al. Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome. *Environ Pollut.* 2018;240:817-30.
282. Calderon-Garciduenas L, Macias-Parra M, Hoffmann HJ, Valencia-Salazar G, Henriquez-Roldan C, Osnaya N, et al. Immunotoxicity and environment: immunodysregulation and systemic inflammation in children. *Toxicol Pathol.* 2009;37(2):161-9.
283. Guarnieri M, Balmes JR. Outdoor air pollution and asthma. *Lancet.* 2014;383(9928):1581-92.
284. Laumbach RJ, Kipen HM. Respiratory health effects of air pollution: update on biomass smoke and traffic pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(1):3-11; quiz 2-3.
285. Rajagopalan S, Brook RD. Air pollution and type 2 diabetes: mechanistic insights. *Diabetes.* 2012;61(12):3037-45.
286. Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, et al. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(3):702-9.
287. Geary RB, Richardson AK, Frampton CM, Dodgshun AJ, Barclay ML. Population-based case control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(2):325-33.
288. Anwar H, Iftikhar A, Muzaffar H, Almatroudi A, Allemailem KS, Navaid S, et al. Biodiversity of Gut Microbiota: Impact of Various Host and Environmental Factors. *Biomed Res Int.* 2021;2021:5575245.
289. Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995;345(8943):176-8.
290. Pambianchi E, Pecorelli A, Valacchi G. Gastrointestinal tissue as a "new" target of pollution exposure. *IUBMB Life.* 2022;74(1):62-73.
291. Lomer MC, Hutchinson C, Volkert S, Greenfield SM, Catterall A, Thompson RP, et al. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br J Nutr.* 2004;92(6):947-55.
292. Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc.* 2002;61(1):123-30.
293. Valentine JL, Kang HK, Spivey G. Arsenic levels in human blood, urine, and hair in response to exposure via drinking water. *Environ Res.* 1979;20(1):24-32.
294. Semmler-Behnke M, Takenaka S, Fertsch S, Wenk A, Seitz J, Mayer P, et al. Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect.* 2007;115(5):728-33.
295. Moller W, Haussinger K, Winkler-Heil R, Stahlhofen W, Meyer T, Hofmann W, et al. Mucociliary and long-term particle clearance in the airways of healthy nonsmoker subjects. *J Appl Physiol (1985).* 2004;97(6):2200-6.
296. Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E. Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *J Crohns Colitis.* 2011;5(4):279-86.
297. Cho CC, Hsieh WY, Tsai CH, Chen CY, Chang HF, Lin CS. In Vitro and In Vivo Experimental Studies of PM2.5 on Disease Progression. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(7).
298. Valacchi G, Magnani N, Woodby B, Ferreira SM, Evelson P. Particulate Matter Induces Tissue OxInflammation: From Mechanism to Damage. *Antioxid Redox Signal.* 2020;33(4):308-26.
299. Soukup JM, Becker S. Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;171(1):20-6.
300. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(9):1689-99.

301. Ovrevik J, Refsnes M, Lag M, Holme JA, Schwarze PE. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules*. 2015;5(3):1399-440.
302. Jin Y, Wu S, Zeng Z, Fu Z. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. *Environ Pollut*. 2017;222:1-9.
303. Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci*. 2015;145(1):5-15.
304. Shukla A, Timblin C, BeruBe K, Gordon T, McKinney W, Driscoll K, et al. Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23(2):182-7.
305. Deng X, Rui W, Zhang F, Ding W. PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PI3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol*. 2013;29(3):143-57.
306. Gautam D, B. Bolia N. Air pollution: impact and interventions. *Air Quality, Atmosphere & Health*. 2020;13(2):209-23.
307. Kaplan GG, Szyszkowicz M, Fichna J, Rowe BH, Porada E, Vincent R, et al. Non-specific abdominal pain and air pollution: a novel association. *PLoS One*. 2012;7(10):e47669.
308. Green C, Elliott L, Beaudoin C, Bernstein CN. A population-based ecologic study of inflammatory bowel disease: searching for etiologic clues. *Am J Epidemiol*. 2006;164(7):615-23; discussion 24-8.
309. Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*. 2005;129(3):827-36.
310. Juillerat P, Pittet V, Bulliard JL, Guessous I, Antonino AT, Mottet C, et al. Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the Canton of Vaud (Switzerland): A population-based cohort study. *J Crohns Colitis*. 2008;2(2):131-41.
311. El-Tawil AM. A population-based case-control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(4):1064.
312. Aujnarain A, Mack DR, Benchimol EI. The role of the environment in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013;15(6):326.
313. Opstelten JL, Beelen RMJ, Leenders M, Hoek G, Brunekreef B, van Schaik FDM, et al. Exposure to Ambient Air Pollution and the Risk of Inflammatory Bowel Disease: A European Nested Case-Control Study. *Dig Dis Sci*. 2016;61(10):2963-71.
314. Orazzo F, Nespoli L, Ito K, Tassinari D, Giardina D, Funis M, et al. Air pollution, aeroallergens, and emergency room visits for acute respiratory diseases and gastroenteric disorders among young children in six Italian cities. *Environ Health Perspect*. 2009;117(11):1780-5.
315. Xu C, Kan HD, Fan YN, Chen RJ, Liu JH, Li YF, et al. Acute effects of air pollution on enteritis admissions in Xi'an, China. *J Toxicol Environ Health A*. 2016;79(24):1183-9.
316. Kaplan GG, Dixon E, Panaccione R, Fong A, Chen L, Szyszkowicz M, et al. Effect of ambient air pollution on the incidence of appendicitis. *CMAJ*. 2009;181(9):591-7.
317. Chen CC, Yang CY. Effects of ambient air pollution exposure on frequency of hospital admissions for appendicitis in Taipei, Taiwan. *J Toxicol Environ Health A*. 2018;81(17):854-60.
318. Tsai SS, Chiu HF, Yang CY. Ambient Air Pollution and Hospital Admissions for Peptic Ulcers in Taipei: A Time-Stratified Case-Crossover Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(11).
319. Elten M, Benchimol EI, Fell DB, Kuenzig ME, Smith G, Chen H, et al. Ambient air pollution and the risk of pediatric-onset inflammatory bowel disease: A population-based cohort study. *Environ Int*. 2020;138:105676.
320. Kish L, Hotte N, Kaplan GG, Vincent R, Tso R, Ganzle M, et al. Environmental particulate matter induces murine intestinal inflammatory responses and alters the gut microbiome. *PLoS One*. 2013;8(4):e62220.
321. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008;453(7191):65-71.

322. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renaud JC, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*. 2008;453(7191):106-9.
323. Li X, Cui J, Yang H, Sun H, Lu R, Gao N, et al. Colonic Injuries Induced by Inhalational Exposure to Particulate-Matter Air Pollution. *Adv Sci (Weinh)*. 2019;6(11):1900180.
324. Mutlu EA, Engen PA, Soberanes S, Urich D, Forsyth CB, Nigdelioglu R, et al. Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2011;8:19.
325. Glencross DA, Ho TR, Camina N, Hawrylowicz CM, Pfeffer PE. Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radic Biol Med*. 2020;151:56-68.
326. McKenzie Z, Kendall M, Mackay RM, Tetley TD, Morgan C, Griffiths M, et al. Nanoparticles modulate surfactant protein A and D mediated protection against influenza A infection in vitro. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015. p. 20140049.
327. De Grove KC, Provoost S, Braun H, Blomme EE, Teufelberger AR, Krysko O, et al. IL-33 signalling contributes to pollutant-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2018;48(12):1665-75.
328. Wang W, Zhou J, Chen M, Huang X, Xie X, Li W, et al. Exposure to concentrated ambient PM<sub>2.5</sub> alters the composition of gut microbiota in a murine model. *Part Fibre Toxicol*. 2018;15(1):17.
329. Tan TK, Saps M, Lin CL, Wei CC. Is Long-term Ambient Air Pollutant Exposure a Risk Factor for Irritable Bowel Syndrome in Children? A 12-year Longitudinal Cohort Study. *J Neurogastroenterol Motil*. 2019;25(2):241-9.
330. Kaplan GG, Tanyingoh D, Dixon E, Johnson M, Wheeler AJ, Myers RP, et al. Ambient ozone concentrations and the risk of perforated and nonperforated appendicitis: a multicity case-crossover study. *Environ Health Perspect*. 2013;121(8):939-43.
331. Gu J, Shi Y, Zhu Y, Chen N, Wang H, Zhang Z, et al. Ambient air pollution and cause-specific risk of hospital admission in China: A nationwide time-series study. *PLoS Med*. 2020;17(8):e1003188.
332. Montero-Montoya R, Lopez-Vargas R, Arellano-Aguilar O. Volatile Organic Compounds in Air: Sources, Distribution, Exposure and Associated Illnesses in Children. *Ann Glob Health*. 2018;84(2):225-38.
333. Spinelle L, Gerboles M, Kok G, Persijn S, Sauerwald T. Review of Portable and Low-Cost Sensors for the Ambient Air Monitoring of Benzene and Other Volatile Organic Compounds. *Sensors (Basel)*. 2017;17(7).
334. Gerin M, Siemiatycki J, Desy M, Krewski D. Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene, and styrene: results of a case-control study in Montreal. *Am J Ind Med*. 1998;34(2):144-56.
335. Dumas S, Parent ME, Siemiatycki J, Brisson J. Rectal cancer and occupational risk factors: a hypothesis-generating, exposure-based case-control study. *Int J Cancer*. 2000;87(6):874-9.
336. Goldberg MS, Parent ME, Siemiatycki J, Desy M, Nadon L, Richardson L, et al. A case-control study of the relationship between the risk of colon cancer in men and exposures to occupational agents. *Am J Ind Med*. 2001;39(6):531-46.
337. Talibov M, Sormunen J, Hansen J, Kjaerheim K, Martinsen JI, Sparen P, et al. Benzene exposure at workplace and risk of colorectal cancer in four Nordic countries. *Cancer Epidemiol*. 2018;55:156-61.
338. Basuroy S, Sheth P, Mansbach CM, Rao RK. Acetaldehyde disrupts tight junctions and adherens junctions in human colonic mucosa: protection by EGF and L-glutamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(2):G367-75.
339. Blair A, Stewart PA, Tolbert PE, Grauman D, Moran FX, Vaught J, et al. Cancer and other causes of death among a cohort of dry cleaners. *Br J Ind Med*. 1990;47(3):162-8.
340. Ruder AM, Ward EM, Brown DP. Cancer mortality in female and male dry-cleaning workers. *J Occup Med*. 1994;36(8):867-74.
341. Pujalte I, Dieme D, Haddad S, Serventi AM, Bouchard M. Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles after inhalation in rats. *Toxicol Lett*. 2017;265:77-85.

342. Kreyling WG, Holzwarth U, Hirn S, Schleh C, Wenk A, Schaffler M, et al. Quantitative biokinetics over a 28 day period of freshly generated, pristine, 20 nm silver nanoparticle aerosols in healthy adult rats after a single 1(1/2)-hour inhalation exposure. Part Fibre Toxicol. 2020;17(1):21.
343. Peters RJB, Oomen AG, van Bommel G, van Vliet L, Undas AK, Munniks S, et al. Silicon dioxide and titanium dioxide particles found in human tissues. Nanotoxicology. 2020;14(3):420-32.
344. Miller MR, Raftis JB, Langrish JP, McLean SG, Samutrtai P, Connell SP, et al. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. ACS Nano. 2017;11(5):4542-52.
345. Van de Wiele T, Vanhaecke L, Boeckaert C, Peru K, Headley J, Verstraete W, et al. Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. Environ Health Perspect. 2005;113(1):6-10.
346. Sawyer K, Mundandhara S, Ghio AJ, Madden MC. The effects of ambient particulate matter on human alveolar macrophage oxidative and inflammatory responses. J Toxicol Environ Health A. 2010;73(1):41-57.
347. Breton CV, Marutani AN. Air Pollution and Epigenetics: Recent Findings. Current Environmental Health Reports. 2014;1(1):35-45.
348. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. Science. 2012;336(6086):1262-7.
349. Alderete TL, Jones RB, Chen Z, Kim JS, Habre R, Lurmann F, et al. Exposure to traffic-related air pollution and the composition of the gut microbiota in overweight and obese adolescents. Environ Res. 2018;161:472-8.
350. Liu T, Chen X, Xu Y, Wu W, Tang W, Chen Z, et al. Gut microbiota partially mediates the effects of fine particulate matter on type 2 diabetes: Evidence from a population-based epidemiological study. Environ Int. 2019;130:104882.
351. Fouladi F, Bailey MJ, Patterson WB, Sioda M, Blakley IC, Fodor AA, et al. Air pollution exposure is associated with the gut microbiome as revealed by shotgun metagenomic sequencing. Environ Int. 2020;138:105604.
352. Hu C, Sheng X, Li Y, Xia W, Zhang B, Chen X, et al. Effects of prenatal exposure to particulate air pollution on newborn mitochondrial DNA copy number. Chemosphere. 2020;253:126592.
353. Fitch MN, Phillippi D, Zhang Y, Lucero J, Pandey RS, Liu J, et al. Effects of inhaled air pollution on markers of integrity, inflammation, and microbiota profiles of the intestines in Apolipoprotein E knockout mice. Environ Res. 2020;181:108913.
354. Fu P, Bai L, Cai Z, Li R, Yung KKL. Fine particulate matter aggravates intestinal and brain injury and affects bacterial community structure of intestine and feces in Alzheimer's disease transgenic mice. Ecotoxicol Environ Saf. 2020;192:110325.
355. Huang CC, Wen HJ, Chen PC, Chiang TL, Lin SJ, Guo YL. Prenatal air pollutant exposure and occurrence of atopic dermatitis. Br J Dermatol. 2015;173(4):981-8.
356. Gorr MW, Velten M, Nelin TD, Youtz DJ, Sun Q, Wold LE. Early life exposure to air pollution induces adult cardiac dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014;307(9):H1353-60.
357. Roberts AL, Lyall K, Hart JE, Laden F, Just AC, Bobb JF, et al. Perinatal air pollutant exposures and autism spectrum disorder in the children of Nurses' Health Study II participants. Environ Health Perspect. 2013;121(8):978-84.
358. Bolton JL, Marinero S, Hassanzadeh T, Natesan D, Le D, Belliveau C, et al. Gestational Exposure to Air Pollution Alters Cortical Volume, Microglial Morphology, and Microglia-Neuron Interactions in a Sex-Specific Manner. Front Synaptic Neurosci. 2017;9:10.
359. Bolton JL, Smith SH, Huff NC, Gilmour MI, Foster WM, Auten RL, et al. Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. FASEB J. 2012;26(11):4743-54.
360. Herr M, Clarisse B, Nikasinovic L, Foucault C, Le Marec AM, Giordanella JP, et al. Does allergic rhinitis exist in infancy? Findings from the PARIS birth cohort. Allergy. 2011;66(2):214-21.
361. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. Gut. 2006;55(6):749-53.

362. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ, Practice Parameters Committee of American College of G. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(2):465-83; quiz 4, 84.
363. Huang BL, Chandra S, Shih DQ. Skin manifestations of inflammatory bowel disease. *Front Physiol*. 2012;3:13.
364. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):6-21.
365. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(12):720-7.
366. Kaplan GG, Ng SC. Globalisation of inflammatory bowel disease: perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016;1(4):307-16.
367. Burke KE, Boumitri C, Ananthakrishnan AN. Modifiable Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017;19(5):21.
368. Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH, Lakatos PL, Loftus EV, Jr., Tysk C, et al. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2013;62(4):630-49.
369. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(4):205-17.
370. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
371. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39(2):207-11.
372. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42(12):1118-25.
373. Hou JK, El-Serag H, Thirumurthi S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(8):2100-9.
374. Joossens M, Simoens M, Vermeire S, Bossuyt X, Geboes K, Rutgeerts P. Contribution of genetic and environmental factors in the pathogenesis of Crohn's disease in a large family with multiple cases. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(5):580-4.
375. Benchimol EI, Kaplan GG, Otley AR, Nguyen GC, Underwood FE, Guttman A, et al. Rural and Urban Residence During Early Life is Associated with Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Inception and Birth Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(9):1412-22.
376. Aamodt G, Jahnsen J, Bengtson MB, Moum B, Vatn MH, Group IS. Geographic distribution and ecological studies of inflammatory bowel disease in southeastern Norway in 1990-1993. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(7):984-91.
377. Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr*. 2009;155(3):421-6.
378. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(5):993-1002.
379. Hou Q, An XQ, Wang Y, Guo JP. An evaluation of resident exposure to respirable particulate matter and health economic loss in Beijing during Beijing 2008 Olympic Games. *Sci Total Environ*. 2010;408(19):4026-32.
380. Jones DT, Osterman MT, Bewtra M, Lewis JD. Passive smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(9):2382-93.
381. Parkes GC, Whelan K, Lindsay JO. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J Crohns Colitis*. 2014;8(8):717-25.

382. Yadav P, Ellinghaus D, Remy G, Freitag-Wolf S, Cesaro A, Degenhardt F, et al. Genetic Factors Interact With Tobacco Smoke to Modify Risk for Inflammatory Bowel Disease in Humans and Mice. *Gastroenterology*. 2017;153(2):550-65.
383. Sheehan D, Moran C, Shanahan F. The microbiota in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2015;50(5):495-507.
384. Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Mitsuyama K, Fujiyama Y, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(8):955-62.
385. Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, et al. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(4):613-9.
386. Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Imaeda H, et al. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*. 2016;93(1):59-65.
387. Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology*. 2017;152(2):327-39 e4.
388. Kahrstrom CT, Pariente N, Weiss U. Intestinal microbiota in health and disease. *Nature*. 2016;535(7610):47.
389. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2369-79.
390. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):260-70.
391. Bingula R, Filaire M, Radosevic-Robin N, Bey M, Berthon JY, Bernalier-Donadille A, et al. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *J Oncol*. 2017;2017:5035371.
392. Marsland BJ, Trompette A, Gollwitzer ES. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12 Suppl 2:S150-6.
393. Cooke KR, Hill GR, Gerbitz A, Kobzik L, Martin TR, Crawford JM, et al. Hyporesponsiveness of donor cells to lipopolysaccharide stimulation reduces the severity of experimental idiopathic pneumonia syndrome: potential role for a gut-lung axis of inflammation. *J Immunol*. 2000;165(11):6612-9.
394. Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol*. 2004;12(12):562-8.
395. Gollwitzer ES, Saglani S, Trompette A, Yadava K, Sherburn R, McCoy KD, et al. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med*. 2014;20(6):642-7.
396. Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases. *Immunity*. 2014;40(6):833-42.
397. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun*. 2015;6:7320.
398. Herbst T, Sichelstiel A, Schar C, Yadava K, Burki K, Cahenzli J, et al. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(2):198-205.
399. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep*. 2012;13(5):440-7.
400. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BL, Skov T, Paludan-Muller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):646-52 e1-5.
401. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(1):129-34.
402. Mohamed-Hussein AA, Mohamed NA, Ibrahim ME. Changes in pulmonary function in patients with ulcerative colitis. *Respir Med*. 2007;101(5):977-82.



403. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-6.
404. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332-45.
405. Wypych TP, Marsland BJ, Ubags NDJ. The Impact of Diet on Immunity and Respiratory Diseases. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(Supplement\_5):S339-S47.
406. Mendez R, Banerjee S, Bhattacharya SK, Banerjee S. Lung inflammation and disease: A perspective on microbial homeostasis and metabolism. *IUBMB Life*. 2019;71(2):152-65.
407. Crawford MS, Nordgren TM, McCole DF. Every breath you take: Impacts of environmental dust exposure on intestinal barrier function—from the gut-lung axis to COVID-19. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2021;320(4):G586-G600.
408. Marra F, Marra CA, Richardson K, Lynd LD, Kozyrskyj A, Patrick DM, et al. Antibiotic use in children is associated with increased risk of asthma. *Pediatrics*. 2009;123(3):1003-10.
409. Metsala J, Lundqvist A, Virta LJ, Kaila M, Gissler M, Virtanen SM. Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):137-45.
410. Russell SL, Gold MJ, Willing BP, Thorson L, McNagny KM, Finlay BB. Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma. *Gut Microbes*. 2013;4(2):158-64.
411. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-30.
412. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(10):1067-75.
413. Nguyen LD, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front Microbiol*. 2015;6:89.
414. Harris JK, De Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, et al. Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20529-33.
415. Huang YJ, Kim E, Cox MJ, Brodie EL, Brown R, Wiener-Kronish JP, et al. A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *OMICS*. 2010;14(1):9-59.
416. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(12):827-35.
417. Goddard AF, Staudinger BJ, Dowd SE, Joshi-Datar A, Wolcott RD, Aitken ML, et al. Direct sampling of cystic fibrosis lungs indicates that DNA-based analyses of upper-airway specimens can misrepresent lung microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(34):13769-74.
418. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio*. 2015;6(2):e00037.
419. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:481-504.
420. Pattaroni C, Watzenboeck ML, Schneidegger S, Kieser S, Wong NC, Bernasconi E, et al. Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways. *Cell Host Microbe*. 2018;24(6):857-65 e4.
421. Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(4):233-43.
422. Rapozo DC, Bernardazzi C, de Souza HS. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World J Gastroenterol*. 2017;23(12):2124-40.
423. Rutten EPA, Lenaerts K, Buurman WA, Wouters EFM. Disturbed intestinal integrity in patients with COPD: effects of activities of daily living. *Chest*. 2014;145(2):245-52.

424. Duricova D, Pedersen N, Elkjaer M, Gamborg M, Munkholm P, Jess T. Overall and cause-specific mortality in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(2):347-53.
425. Keely S, Talley NJ, Hansbro PM. Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. *Mucosal Immunol*. 2012;5(1):7-18.
426. Edwards FC, Truelove SC. The Course and Prognosis of Ulcerative Colitis. *Gut*. 1963;4:299-315.
427. Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2006;12(30):4819-31.
428. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(4):1116-22.
429. Black H, Mendoza M, Murin S. Thoracic manifestations of inflammatory bowel disease. *Chest*. 2007;131(2):524-32.
430. Peng YH, Liao WC, Su CH, Chen HJ, Hsia TC, Chu CC, et al. Association of inflammatory bowel disease with asthma risk: A nationwide cohort study. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36(5):e92-8.
431. Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*. 2011;3(6):637-82.
432. Dang AT, Marsland BJ. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis. *Mucosal Immunol*. 2019;12(4):843-50.
433. Wang J, Li F, Wei H, Lian ZX, Sun R, Tian Z. Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation. *J Exp Med*. 2014;211(12):2397-410.
434. Sze MA, Tsuruta M, Yang SW, Oh Y, Man SF, Hogg JC, et al. Changes in the bacterial microbiota in gut, blood, and lungs following acute LPS instillation into mice lungs. *PLoS One*. 2014;9(10):e111228.
435. Perrone EE, Jung E, Breed E, Dominguez JA, Liang Z, Clark AT, et al. Mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia-induced intestinal epithelial apoptosis. *Shock*. 2012;38(1):68-75.
436. Coopersmith CM, Stromberg PE, Davis CG, Dunne WM, Amiot DM, 2nd, Karl IE, et al. Sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia decreases intestinal proliferation and induces gut epithelial cell cycle arrest. *Crit Care Med*. 2003;31(6):1630-7.
437. Husted AS, Trauelsen M, Rudenko O, Hjorth SA, Schwartz TW. GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metab*. 2017;25(4):777-96.
438. Li M, van Esch B, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2018;831:52-9.
439. Eksteen B, Grant AJ, Miles A, Curbishley SM, Lalor PF, Hubscher SG, et al. Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis. *J Exp Med*. 2004;200(11):1511-7.
440. Ruane D, Brane L, Reis BS, Cheong C, Poles J, Do Y, et al. Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2013;210(9):1871-88.
441. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005;6(5):507-14.
442. Takai T. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol Int*. 2012;61(1):3-17.
443. Scaldaferri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2009;136(2):585-95 e5.
444. Vargas-Rojas MI, Ramirez-Venegas A, Limon-Camacho L, Ochoa L, Hernandez-Zenteno R, Sansores RH. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2011;105(11):1648-54.
445. Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(5):997-1008; quiz 9.

446. Tulic MK, Vivinus-Nebot M, Rekima A, Rabelo Medeiros S, Bonnart C, Shi H, et al. Presence of commensal house dust mite allergen in human gastrointestinal tract: a potential contributor to intestinal barrier dysfunction. *Gut*. 2016;65(5):757-66.
447. Wang J, Doussin JF, Perrier S, Perraudin E, Katrib Y, Pangui E, et al. Design of a new multi-phase experimental simulation chamber for atmospheric photosmog, aerosol and cloud chemistry research. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2011;4(11):2465-94.
448. Vance ME, Marr LC. Exposure to airborne engineered nanoparticles in the indoor environment. *Atmospheric Environment*. 2015;106:503-9.
449. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Jr., Rejeski D, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol*. 2015;6:1769-80.
450. Park SB, Jung WH, Kim KY, Koh B. Toxicity Assessment of SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> in Normal Colon Cells, In Vivo and in Human Colon Organoids. *Molecules*. 2020;25(16).
451. Corpet DE, Pierre F. Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12(5):391-400.
452. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;109(4):1344-67.
453. Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. 2016;66:76-88.
454. Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech*. 2015;8(1):1-16.
455. Xiao L, Feng Q, Liang S, Sonne SB, Xia Z, Qiu X, et al. A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat Biotechnol*. 2015;33(10):1103-8.
456. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-5.
457. Hildebrand F, Nguyen TL, Brinkman B, Yunta RG, Cauwe B, Vandenabeele P, et al. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome Biol*. 2013;14(1):R4.
458. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80.
459. Neyrinck AM, Possemiers S, Druart C, Van de Wiele T, De Backer F, Cani PD, et al. Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2011;6(6):e20944.
460. Zhang C, Zhang M, Pang X, Zhao Y, Wang L, Zhao L. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J*. 2012;6(10):1848-57.
461. Coll P, Cazaunau M, Boczkowski J, Zysman M, Doussin J-F, Gratien A, et al. Pollurisk: An Innovative Experimental Platform to Investigate Health Impacts of Air Quality. *Air Pollution XXVI2018*. p. 557-65.
462. Gatti AM. Biocompatibility of micro- and nano-particles in the colon. Part II. *Biomaterials*. 2004;25(3):385-92.
463. Feng J, Cavallero S, Hsiai T, Li R. Impact of air pollution on intestinal redox lipidome and microbiome. *Free Radic Biol Med*. 2020;151:99-110.
464. Backes CH, Nelin T, Gorr MW, Wold LE. Early life exposure to air pollution: how bad is it? *Toxicol Lett*. 2013;216(1):47-53.
465. <A breath of fresh air on the mesenchyme impact of impaired mesenchymal development on the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia Chao 2015.pdf>.
466. Beaumont M, Paes C, Mussard E, Knudsen C, Cauquil L, Aymard P, et al. Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes*. 2020;11(5):1268-86.

467. Navis M, Martins Garcia T, Renes IB, Vermeulen JL, Meisner S, Wildenberg ME, et al. Mouse fetal intestinal organoids: new model to study epithelial maturation from suckling to weaning. *EMBO Rep.* 2019;20(2).
468. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res.* 2011;317(19):2702-10.
469. Gascon M, Morales E, Sunyer J, Vrijheid M. Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: a systematic review. *Environ Int.* 2013;52:51-65.
470. Menard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C, Leveque M, Naturel M, Sekkal S, et al. Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *PLoS One.* 2014;9(11):e112752.
471. Liu W, Zhou Y, Qin Y, Li Y, Yu L, Li R, et al. Sex-specific effects of PM2.5 maternal exposure on offspring's serum lipoproteins and gut microbiota. *Sci Total Environ.* 2020;739:139982.
472. Deng Q, Lu C, Li Y, Sundell J, Dan N. Exposure to outdoor air pollution during trimesters of pregnancy and childhood asthma, allergic rhinitis, and eczema. *Environ Res.* 2016;150:119-27.
473. Lu C, Norback D, Li Y, Deng Q. Early-life exposure to air pollution and childhood allergic diseases: an update on the link and its implications. *Expert Rev Clin Immunol.* 2020;16(8):813-27.
474. Wong GW, Ko FW, Lau TS, Li ST, Hui D, Pang SW, et al. Temporal relationship between air pollution and hospital admissions for asthmatic children in Hong Kong. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(4):565-9.
475. Lee SL, Wong WH, Lau YL. Association between air pollution and asthma admission among children in Hong Kong. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(9):1138-46.
476. Ko FW, Tam W, Wong TW, Lai CK, Wong GW, Leung TF, et al. Effects of air pollution on asthma hospitalization rates in different age groups in Hong Kong. *Clin Exp Allergy.* 2007;37(9):1312-9.
477. Cheng MH, Chen CC, Chiu HF, Yang CY. Fine particulate air pollution and hospital admissions for asthma: a case-crossover study in Taipei. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(18):1075-83.
478. <Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine chin2017.pdf>.
479. Arevalo Sureda E, Westrom B, Pierzynowski SG, Prykhodko O. Maturation of the Intestinal Epithelial Barrier in Neonatal Rats Coincides with Decreased FcRn Expression, Replacement of Vacuolated Enterocytes and Changed Blimp-1 Expression. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164775.
480. Westrom B, Arevalo Sureda E, Pierzynowska K, Pierzynowski SG, Perez-Cano FJ. The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Front Immunol.* 2020;11:1153.
481. Lamas B, Martins Breyner N, Houdeau E. Impacts of foodborne inorganic nanoparticles on the gut microbiota-immune axis: potential consequences for host health. *Part Fibre Toxicol.* 2020;17(1):19.
482. Theegarten D, Boukercha S, Philippou S, Anhenn O. Submesothelial deposition of carbon nanoparticles after toner exposition: case report. *Diagn Pathol.* 2010;5:77.
483. Bergin IL, Witzmann FA. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol.* 2013;3(1-2).
484. Allais L, Kerckhof FM, Verschuere S, Bracke KR, De Smet R, Laukens D, et al. Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. *Environ Microbiol.* 2016;18(5):1352-63.
485. van Herwaarden AE, Wagenaar E, van der Kruijssen CM, van Waterschoot RA, Smit JW, Song JY, et al. Knockout of cytochrome P450 3A yields new mouse models for understanding xenobiotic metabolism. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3583-92.
486. Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280(5):G922-9.
487. Espey MG. Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. *Free Radic Biol Med.* 2013;55:130-40.
488. Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, Kurilshikov A, Vich Vila A, Vosa U, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet.* 2019;51(4):600-5.

489. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*. 2012;3(4):289-306.
490. Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev*. 1997;6 Suppl 1:S43-5.
491. Zhai Q, Li T, Yu L, Xiao Y, Feng S, Wu J, et al. Effects of subchronic oral toxic metal exposure on the intestinal microbiota of mice. *Science Bulletin*. 2017;62(12):831-40.
492. Li P, Lei J, Hu G, Chen X, Liu Z, Yang J. Matrine Mediates Inflammatory Response via Gut Microbiota in TNBS-Induced Murine Colitis. *Front Physiol*. 2019;10:28.
493. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1844-54 e1.
494. Chiodini RJ, Dowd SE, Chamberlin WM, Galandiuk S, Davis B, Glassing A. Microbial Population Differentials between Mucosal and Submucosal Intestinal Tissues in Advanced Crohn's Disease of the Ileum. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134382.
495. Murros KE, Huynh VA, Takala TM, Saris PEJ. *Desulfovibrio* Bacteria Are Associated With Parkinson's Disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:652617.
496. Sikora M, Stec A, Chrabaszcz M, Knot A, Waskiel-Burnat A, Rakowska A, et al. Gut Microbiome in Psoriasis: An Updated Review. *Pathogens*. 2020;9(6).
497. Alexander M, Ang QY, Nayak RR, Bustion AE, Sandy M, Zhang B, et al. Human gut bacterial metabolism drives Th17 activation and colitis. *Cell Host Microbe*. 2022;30(1):17-30 e9.
498. Thota VR, Dacha S, Natarajan A, Nerad J. *Eggerthella lenta* bacteremia in a Crohn's disease patient after ileocecal resection. *Future Microbiol*. 2011;6(5):595-7.
499. Stojanov S, Berlec A, Strukelj B. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. *Microorganisms*. 2020;8(11).
500. Dou X, Gao N, Yan D, Shan A. Sodium Butyrate Alleviates Mouse Colitis by Regulating Gut Microbiota Dysbiosis. *Animals (Basel)*. 2020;10(7).
501. Munyaka PM, Rabbi MF, Khafipour E, Ghia JE. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *J Basic Microbiol*. 2016;56(9):986-98.
502. Kuhn KA, Schulz HM, Regner EH, Severs EL, Hendrickson JD, Mehta G, et al. Bacteroidales recruit IL-6-producing intraepithelial lymphocytes in the colon to promote barrier integrity. *Mucosal Immunol*. 2018;11(2):357-68.
503. Loh G, Blaut M. Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes*. 2012;3(6):544-55.
504. Zhou Y, Zhi F. Lower Level of Bacteroides in the Gut Microbiota Is Associated with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5828959.
505. Pineton de Chambrun G, Body-Malapel M, Frey-Wagner I, Djouina M, Deknuydt F, Atrott K, et al. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol*. 2014;7(3):589-601.
506. Tulinska J, Masanova V, Liskova A, Mikusova ML, Rollerova E, Krivosikova Z, et al. Six-week inhalation of CdO nanoparticles in mice: The effects on immune response, oxidative stress, antioxidative defense, fibrotic response, and bones. *Food Chem Toxicol*. 2020;136:110954.
507. Thaver S, Foa L, Richards SM, Lyons AB, Zosky GR. In utero exposure to diesel exhaust particles, but not silica, alters post-natal immune development and function. *Chemosphere*. 2021;268:129314.
508. Rinninella E, Cintoni M, Raoul P, Mora V, Gasbarrini A, Mele MC. Impact of Food Additive Titanium Dioxide on Gut Microbiota Composition, Microbiota-Associated Functions, and Gut Barrier: A Systematic Review of In Vivo Animal Studies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(4).
509. Kampfer AAM, Busch M, Buttner V, Bredeck G, Stahlmecke B, Hellack B, et al. Model Complexity as Determining Factor for In Vitro Nanosafety Studies: Effects of Silver and Titanium Dioxide Nanomaterials in Intestinal Models. *Small*. 2021;17(15):e2004223.
510. Gokulan K, Williams K, Orr S, Khare S. Human Intestinal Tissue Explant Exposure to Silver Nanoparticles Reveals Sex Dependent Alterations in Inflammatory Responses and Epithelial Cell Permeability. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).

511. Braakhuis HM, Gosens I, Krystek P, Boere JA, Cassee FR, Fokkens PH, et al. Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:49.
512. Kreyling WG, Holzwarth U, Schleh C, Hirn S, Wenk A, Schaffler M, et al. Quantitative biokinetics over a 28 day period of freshly generated, pristine, 20 nm titanium dioxide nanoparticle aerosols in healthy adult rats after a single two-hour inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol.* 2019;16(1):29.
513. Kreyling WG, Holzwarth U, Schleh C, Kozempel J, Wenk A, Haberl N, et al. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology.* 2017;11(4):443-53.
514. Choi J, Kim H, Kim P, Jo E, Kim HM, Lee MY, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in rats treated by two different routes: single intravenous injection and single oral administration. *J Toxicol Environ Health A.* 2015;78(4):226-43.
515. Lee JH, Kim YS, Song KS, Ryu HR, Sung JH, Park JD, et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:36.
516. Geiser M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010;23(4):207-17.
517. Li D, Morishita M, Wagner JG, Fatouraie M, Wooldridge M, Eagle WE, et al. In vivo biodistribution and physiologically based pharmacokinetic modeling of inhaled fresh and aged cerium oxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13(1):45.
518. Wei J, Xiong XF, Lin YH, Zheng BX, Cheng DY. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ.* 2015;3:e1199.
519. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2005;28(3):187-96.
520. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beaufils F, Wieers G, Guery B, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:9.
521. Li R, Yang J, Saffari A, Jacobs J, Baek KI, Hough G, et al. Ambient Ultrafine Particle Ingestion Alters Gut Microbiota in Association with Increased Atherogenic Lipid Metabolites. *Sci Rep.* 2017;7:42906.
522. Liu S, Qin P, Wang J. High-Fat Diet Alters the Intestinal Microbiota in Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Mice. *Microorganisms.* 2019;7(6).
523. Heederik D, Brouwer R, Biersteker K, Boleij JS. Relationship of airborne endotoxin and bacteria levels in pig farms with the lung function and respiratory symptoms of farmers. *Int Arch Occup Environ Health.* 1991;62(8):595-601.
524. Kho ZY, Lal SK. The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Front Microbiol.* 2018;9:1835.
525. Chiu L, Bazin T, Truchetet ME, Schaefferbeke T, Delhaes L, Pradeu T. Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Front Immunol.* 2017;8:1678.
526. McAleer JP, Kolls JK. Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *Eur J Immunol.* 2018;48(1):39-49.
527. Trompette A, Gollwitzer ES, Pattaroni C, Lopez-Mejia IC, Riva E, Pernot J, et al. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c(-) Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8(+) T Cell Metabolism. *Immunity.* 2018;48(5):992-1005 e8.
528. Dias C, Duarte-Ribeiro F, Pipa S, Mota M. A Rare and Potentially Catastrophic Infection: Primary Intestinal Aspergillosis-Case Report in an HIV Patient. *Case Rep Infect Dis.* 2018;2018:3269847.
529. Woodby B, Schiavone ML, Pambianchi E, Mastaloudis A, S NH, S MW, et al. Particulate Matter Decreases Intestinal Barrier-Associated Proteins Levels in 3D Human Intestinal Model. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(9).
530. Scales BS, Dickson RP, Huffnagle GB. A tale of two sites: how inflammation can reshape the microbiomes of the gut and lungs. *J Leukoc Biol.* 2016;100(5):943-50.

531. Rutting S, Xenaki D, Malouf M, Horvat JC, Wood LG, Hansbro PM, et al. Short-chain fatty acids increase TNF $\alpha$ -induced inflammation in primary human lung mesenchymal cells through the activation of p38 MAPK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019;316(1):L157-L74.
532. Vieira RS, Castoldi A, Basso PJ, Hiyane MI, Camara NOS, Almeida RR. Butyrate Attenuates Lung Inflammation by Negatively Modulating Th9 Cells. *Front Immunol*. 2019;10:67.
533. Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*. 2011;3(10):858-76.
534. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertil Steril*. 2013;99(3):607-15.
535. Webster AL, Yan MS, Marsden PA. Epigenetics and cardiovascular disease. *Can J Cardiol*. 2013;29(1):46-57.
536. Clifford RL, Jones MJ, Maclsaac JL, McEwen LM, Goodman SJ, Mostafavi S, et al. Inhalation of diesel exhaust and allergen alters human bronchial epithelium DNA methylation. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):112-21.
537. Jenke AC, Zilbauer M. Epigenetics in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28(6):577-84.
538. Salam MT, Zhang Y, Begum K. Epigenetics and childhood asthma: current evidence and future research directions. *Epigenomics*. 2012;4(4):415-29.
539. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012;150(1):12-27.
540. Waldmann T, Schneider R. Targeting histone modifications--epigenetics in cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25(2):184-9.
541. Tsamou M, Vrijens K, Madhloum N, Lefebvre W, Vanpoucke C, Nawrot TS. Air pollution-induced placental epigenetic alterations in early life: a candidate miRNA approach. *Epigenetics*. 2018;13(2):135-46.
542. Shukla A, Bunkar N, Kumar R, Bhargava A, Tiwari R, Chaudhury K, et al. Air pollution associated epigenetic modifications: Transgenerational inheritance and underlying molecular mechanisms. *Sci Total Environ*. 2019;656:760-77.
543. Benchimol EI, Mack DR, Guttman A, Nguyen GC, To T, Mojaverian N, et al. Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(4):553-63.
544. Kellermayer R, van der Laan M. Validation of Predictive Models in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2021;160(1):21-2.
545. Li X, Sundquist J, Hemminki K, Sundquist K. Risk of inflammatory bowel disease in first- and second-generation immigrants in Sweden: a nationwide follow-up study. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(8):1784-91.
546. Nagy-Szakal D, Ross MC, Dowd SE, Mir SA, Schaible TD, Petrosino JF, et al. Maternal micronutrients can modify colonic mucosal microbiota maturation in murine offspring. *Gut Microbes*. 2012;3(5):426-33.
547. Mir SA, Nagy-Szakal D, Dowd SE, Szigeti RG, Smith CW, Kellermayer R. Prenatal methyl-donor supplementation augments colitis in young adult mice. *PLoS One*. 2013;8(8):e73162.
548. Schaible TD, Harris RA, Dowd SE, Smith CW, Kellermayer R. Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Hum Mol Genet*. 2011;20(9):1687-96.
549. Kraicy J, Nayak KM, Howell KJ, Ross A, Forbester J, Salvestrini C, et al. DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut*. 2019;68(1):49-61.
550. Turpin W, Goethel A, Bedrani L, Croitoru Mdcm K. Determinants of IBD Heritability: Genes, Bugs, and More. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(6):1133-48.
551. Kellermayer R. Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases. *Can J Gastroenterol*. 2012;26(12):909-15.

552. Tschurtschenthaler M, Kachroo P, Heinsen FA, Adolph TE, Ruhlemann MC, Klughammer J, et al. Paternal chronic colitis causes epigenetic inheritance of susceptibility to colitis. *Sci Rep.* 2016;6:31640.
553. Iavicoli I, Fontana L, Leso V, Calabrese EJ. Hormetic dose-responses in nanotechnology studies. *Sci Total Environ.* 2014;487:361-74.
554. Lopez RN, Leach ST, Lemberg DA, Duvoisin G, Gearry RB, Day AS. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017;32(3):577-82.