

# Nanoparticules de dioxyde de titane : impact de la cristallinité et rôle de la voie de signalisation Wnt dans leur toxicité.

Isabelle PASSAGNE | isabelle.passagne@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux, Inserm U1034 « Biologie des maladies cardiovasculaires », Bordeaux

Mots clés : Cristallinité, nanoparticules, neurones, toxicité, Wnt

Les nanoparticules de dioxyde de titane (NP-TiO<sub>2</sub>) sont largement utilisées dans diverses applications industrielles telles l'industrie du papier, des peintures, des plastiques. Les NP-TiO<sub>2</sub> se retrouvent également dans l'alimentation ou les cosmétiques. A l'heure actuelle, leur impact sur la santé humaine reste incertain. Il existe pourtant de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* sur leurs effets toxiques mais les résultats sont souvent contradictoires, probablement en raison d'une grande variété de taille ou de cristallinité. Dans ce contexte, l'article de YU et al. compare les effets engendrés par deux formes cristallines différentes : anatase et rutile. Les mécanismes connexes sont étudiés, comme le stress oxydant, l'autophagie, l'apoptose ou la nécrose. Dans l'article de Hong et al., les auteurs explorent une nouvelle piste de toxicité en abordant l'impact des NP-TiO<sub>2</sub> sur la voie de signalisation Wnt\*, une voie essentielle dans la régulation du développement neuronal. En effet, il a été montré précédemment que les NP-TiO<sub>2</sub> peuvent induire une neurotoxicité avec perturbation des transmissions glutaminergiques. Le glutamate\* permet l'activation des récepteurs NMDAR\* et un défaut d'activation des NMDAR\* peut affecter la signalisation Wnt\* et en conséquence, supprimer le développement dendritique.

## Différente toxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, sous forme anatase ou rutile, évaluée sur des macrophages: implication de leur différence d'affinité pour les protéines et les phospholipides

YU Q. et al. (2017). Different toxicity of anatase and rutile TiO<sub>2</sub> nanoparticles on macrophages: Involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids. *Journal of Hazardous Materials*, 335 : p.125-134.

### Résumé

Ce projet étudie l'influence de la cristallinité sur la toxicité des NP-TiO<sub>2</sub>. Pour ce faire, les auteurs ont synthétisé des NP-TiO<sub>2</sub> anatase (TiO<sub>2</sub>-A) et rutile (TiO<sub>2</sub>-R), de taille primaire, de surface spécifique, avec un potentiel Zeta similaires. Néanmoins, les deux types de NP-TiO<sub>2</sub> forment des agrégats dans le milieu de culture, les agrégats avec TiO<sub>2</sub>-R étant plus grands. Leur toxicité est évaluée sur des macrophages murins. L'exposition aux deux types de NP-TiO<sub>2</sub>, à des concentrations importantes (de 2,5 à 200mg/L), conduit à une diminution de la viabilité cellulaire, et montre une toxicité dose-dépendante. Les TiO<sub>2</sub>-R révèlent néanmoins une toxicité plus importante : la viabilité est diminuée à la plus faible concentration. D'après l'analyse en ICP-MS\*, la quantité de TiO<sub>2</sub>-R ayant pénétré dans les macrophages est similaire à celle obtenue avec TiO<sub>2</sub>-A. La différence de toxicité n'est donc pas liée à une différence de pénétration, et donc d'exposition des macrophages. Il n'y a pas de différence significative concernant la quantité d'ERO\* produite dans les macrophages exposés. Par conséquent, un autre mécanisme que le stress oxydant est mis en jeu pour la

toxicité des rutilés. Aucune différence d'autophagie n'est observée. Par contre, le nombre de cellules nécrotiques détectées en cytométrie de flux est plus important avec TiO<sub>2</sub>-R. En accord avec la nécrose, des ruptures de la membrane plasmique et des dommages au niveau des lysosomes sont visibles en microscopie TEM\*, 30% des lysosomes étant altérés avec TiO<sub>2</sub>-R. Une augmentation de la perméabilisation de la membrane des lysosomes est aussi mise en évidence avec un marquage. Par contre avec TiO<sub>2</sub>-A, les lysosomes restent intacts malgré une localisation lysosomale des TiO<sub>2</sub>-A. L'étude de la mitochondrie montre une inhibition de la respiration mitochondriale en présence de TiO<sub>2</sub>-A ainsi qu'une apoptose détectée en cytométrie. Pour les auteurs, il pourrait avoir des différences d'interaction avec les biomolécules. Afin de vérifier cela, les NP-TiO<sub>2</sub> ont été mis en contact avec deux types de biomolécules : des protéines et des phospholipides. On note que les TiO<sub>2</sub>-A s'adsorbent plus facilement sur des protéines alors que les TiO<sub>2</sub>-R présentent une affinité plus élevée pour les phospholipides. Pour les auteurs, au vu des observations en microscopie, les TiO<sub>2</sub>-R adhèrent majoritairement à la surface interne de la membrane lysosomale, contrairement aux TiO<sub>2</sub>-A. La forte interaction avec les phospholipides, un constituant majeur de la membrane, explique les dommages membranaires et lysosomales observés. Ces dommages précèderaient le mécanisme de nécrose non ERO\*-dépendant.

### Commentaire

Le rôle de la cristallinité dans les mécanismes de toxicité n'est pas toujours clair et nécessite d'être exploré. Les auteurs ont

choisi de tester leur NP-TiO<sub>2</sub> sur des macrophages, cellules fréquemment exposées *in vivo* aux particules. L'un des points remarquables est que les NP-TiO<sub>2</sub> anatase et rutile testées, ont été synthétisées en utilisant le même substrat. Après fabrication, le seul paramètre physico-chimique qui varie est leur cristallinité. La partie caractérisation des NP-TiO<sub>2</sub> est bien documentée, ce qui permet la comparaison avec d'autres études. Il faut noter que les concentrations utilisées lors de l'exposition sont assez importantes et ceci à des fins d'observation d'effets. Dans cet article, la forme rutile possède une toxicité plus élevée que la forme anatase. Ceci est en désaccord avec la littérature. Néanmoins, dans la majorité des études, les NP-TiO<sub>2</sub> ne varient pas seulement par leur cristallinité, mais aussi par leur taille, leur forme, leur surface et/ou le protocole de synthèse. De plus, la forme anatase est décrite comme pénétrant en plus grande quantité (1-2). Ceci peut expliquer la plus grande toxicité observée. D'une façon intéressante, cette étude met en avant que la réponse biologique diffère en fonction de la cristallinité et que cette différence de toxicité n'est pas due à une différence d'internalisation, comme observé dans des études où la forme rutile s'est avérée plus toxique (3-4). La forme rutile induit plutôt une nécrose contrairement à la forme anatase qui induit une apoptose. Pour les auteurs, c'est l'accumulation des TiO<sub>2</sub>-R à la surface interne de la membrane des lysosomes qui conduit aux altérations. La libération d'enzymes hydrolytiques et l'augmentation du pH cytoplasmique, entraînerait la nécrose. L'étude de l'affinité des NP-TiO<sub>2</sub> est une approche importante de ce travail. Il prouve la plus grande affinité des TiO<sub>2</sub>-R pour les phospholipides, donc pour la membrane. Il est regrettable que les images de microscopie fournies par les auteurs ne soient pas plus évocatrices d'une différence de localisation cellulaire entre ces deux NP-TiO<sub>2</sub>. En anatases. Les images en TEM montrent que la taille primaire est de 5 à 6 nm. Le diamètre hydrodynamique est compris entre 100nm et 300nm. L'exposition à ces NP-TiO<sub>2</sub> à de fortes concentrations, jusqu'à 5mg/L, conduit à des altérations du développement des cellules neuronales. Des modifications morphologiques sont visibles en microscopie, au niveau des neurites\* avec diminution du marquage dirigé contre MAP2\*, un marqueur d'intégrité neuronale. Les altérations observées dépendent de la dose et du temps. Pour exemple, la longueur de neurites\* est diminuée respectivement de 9%, 26% et 32% après 2, 5 et 8 jours d'exposition à la plus faible dose. Les neurones exposés voient aussi leur nombre de branches et d'épines dendritiques\* diminué. Des dommages mitochondriaux sont également présents avec dépolarisation de la membrane. D'un point de vue moléculaire, le niveau d'expression de plusieurs protéines est considérablement réduit dans les neurones. Il s'agit de protéines impliquées dans la signalisation canonique : Wnt3a\*, β-caténine\* et cycline D1\*. La diminution de la cycline D1 suggère un arrêt de la prolifération cellulaire. Cette inhibition de la voie canonique Wnt\* est en accord avec l'augmentation de l'expression de la protéine inhibitrice GSK3β\*, provoquant la dégradation de la protéine clé, la β-caténine\*. Parallèlement, il y a perturbation de la voie Wnt\* non canonique avec diminution de l'expression de MKLP1\*, CRMP3\*, ErbB4\* et KIF17\*. En inhibant la voie non canonique, les NP-TiO<sub>2</sub> peuvent perturber le cytosquelette ou les microtubules cellulaires. En effet, MKLP1\* est responsable de la répartition et du transport des microtubules dans les dendrites en développement. En complément, les protéines CRMPs\* jouent un rôle essentiel dans la croissance des neurites. Les

effet, une localisation de TiO<sub>2</sub>-A au niveau des mitochondries viendrait supporter l'hypothèse d'une interaction des TiO<sub>2</sub>-R avec les protéines mitochondriales. Une analyse protéomique pourrait ouvrir des pistes mécanistiques intéressantes car dans cette étude, l'interaction de l'anatase cible les protéines et peut être des protéines mitochondriales. Il serait aussi intéressant d'avoir une idée de la part d'anion superoxyde formé du fait de la perturbation de la respiration mitochondriale. En effet, l'ajout de NAC\* un agent antioxydant atténue partiellement les dommages dans les cellules traitées à l'anatase ; ce qui indique que le stress oxydant est en partie impliqué dans sa toxicité.

### L'inhibition de la voie de signalisation Wnt induite par des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> provoque un trouble du développement dendritique dans des cultures de neurones de rat

HONG F. et al. (2017). Nanoparticulate TiO<sub>2</sub>-mediated inhibition of the Wnt signaling pathway causes dendritic development disorder in cultured rat hippocampal neurons. *J Biomed Mater Res A*, 105 (8) : p.2139-2149.

#### Résumé

Dans cet article, les effets de NP-TiO<sub>2</sub> sur le développement et la morphologie dendritique ont été étudiés. Les mécanismes potentiellement associés à ces perturbations neuronales sont abordés avec la mesure de l'expression de protéines impliquées dans la voie de signalisation Wnt\*. Les NP-TiO<sub>2</sub> testées sont des

perturbations de ErbB4\* et KIF17\* peuvent quant à elles, être le signe de survenue de perturbations des transmissions glutaminergiques.

#### Commentaire

Dans cette étude, le choix de cellules neuronales issues de l'hippocampe est un choix judicieux. En effet, c'est une zone majeure d'accumulation des NP-TiO<sub>2</sub> après instillation (5-6). D'ailleurs, des dommages ont déjà été observés avec la présence de vacuoles, de dégénérescence grasseuse ou d'arrangement dispersé des neurones dans la région CA1 de l'hippocampe. Ce choix de l'hippocampe est avisé car il joue un rôle clé dans l'apprentissage et la mémoire. De plus, un lien a été établi entre NP-TiO<sub>2</sub> et la perturbation d'un neurotransmetteur, le glutamate responsable de la transmission au niveau des dendrites en CA1 (7). Les auteurs explorent une voie peu étudiée en toxicité, celle de la signalisation Wnt\*. Moins de dix articles existent sur ce sujet. Ce travail est très intéressant car il relie les altérations morphologiques obtenues dans les neurones à l'inhibition des voies Wnt\* canoniques et non canoniques. Les modifications des épines dendritiques sont souvent associées à des troubles de l'apprentissage et de la mémoire. Un résultat similaire a été obtenu dans une étude menée sur des kératinocytes où l'expression de la β-Caténine et de la E-Cadhérine est régulée à la baisse (8). Ce complexe protéique joue un rôle dans le maintien de l'intégrité épithéliale. Dans l'article analysé, les auteurs se limitent à l'analyse morphologique des cellules

neuronaux pour déterminer un impact neurotoxique. Il aurait été intéressant d'évaluer le potentiel toxique des NP-TiO<sub>2</sub> en utilisant un test de cytotoxicité (métabolisation du MTT\* ou libération de LDH\*). Une altération du potentiel membranaire mitochondriale (MMP) ayant été détectée, une mesure des ERO\* produits aurait été un plus car une quantité élevée d'ERO peut être à l'origine de cette perturbation. Ceci d'autant que la voie Wnt\* peut être régulée par les ERO. En effet, une protéine liée à la thiorédoxine, la nucléoredoxine (NRX), bloque l'activation de la voie Wnt, en interagissant avec Dvl\* (Disheveled), une protéine essentielle pour cette signalisation (9). La discussion autour du mécanisme est malheureusement peu appuyée. Les auteurs suggèrent une connexion avec les récepteurs NMDAR car leur activation module le développement neurologique via la voie Wnt\*. Au vu des résultats prometteurs, il paraît important de pousser plus loin les investigations pour mieux comprendre le mécanisme, d'autant qu'il a été montré que les nanoparticules de silice bloquent la transduction du signal Wnt\*, en visant la protéine Dvl\* (10).

### CONCLUSION GÉNÉRALE

Bien que les NP-TiO<sub>2</sub> soient utilisées dans de nombreuses applications commerciales, les dangers restent encore méconnus. L'article de YU et al. est particulièrement intéressant car les auteurs s'attachent à évaluer l'influence de la cristallinité dans leur toxicité. Dans cette étude, les NP-TiO<sub>2</sub> ne diffèrent que par leur cristallinité du fait d'un protocole de synthèse bien pensé. Il faut garder en mémoire que dans un milieu biologique de nombreux agrégats sont formés, ce qui modifie la taille des NPs. Les auteurs ont démontré que la réponse biologique faisant suite à l'exposition, varie bien en fonction de la cristallinité. Les NP-TiO<sub>2</sub> rutile, en s'accumulant au niveau de la surface interne de la membrane des lysosomes et en l'altérant, conduisent à une nécrose. La forme anatase par un mécanisme dépendant du stress oxydant, déclenche majoritairement une apoptose via la survenue de dommages mitochondriaux. Déterminer la toxicité spécifique de la forme anatase ou rutile reste encore un enjeu difficile. Il est fort probable qu'une variété de facteurs agisse pour dicter la réponse toxique. Actuellement, l'étude des effets sur le cerveau semble être un domaine de recherche en plein essor. L'article de Hong et al. montre que l'exposition de cellules neuronales à des NP-TiO<sub>2</sub> engendre des altérations des neurites. Ceci est relié pour la première fois à l'inhibition de la voie de signalisation Wnt, une voie clé du développement. Cet article ouvre une piste de recherche intéressante pour de nouveaux travaux visant à relier ces données à la perturbation des transmissions glutaminergiques déjà observée dans les neurones exposés.

### GENERAL CONCLUSION

*Although NP-TiO<sub>2</sub> is used in many commercial applications, specific toxicity is still unknown. Article 1 is particularly interesting because the authors attempt to evaluate the influence of crystallinity. In this study, NP-TiO<sub>2</sub> differs only in their crystallinity due to a well thought-out synthesis protocol. The authors demonstrated that the biological response varies well with crystallinity. The Rutile form leads to necrosis by accumulating at the level of the internal surface of the lysosome membrane and by altering it. The anatase form by a mechanism dependent on oxidative stress, mostly triggers apoptosis via the occurrence of mitochondrial damages. At present, the study of effects on the brain seems to be a great research area. Article 2 demonstrates that the exposure to NP-TiO<sub>2</sub> generates many alterations of neuronal cells. For the first time, this result is connected to the inhibition of Wnt signaling pathway, a key pathway to development. This article opens up an interesting research pathway that can initiate new work attempting to link these data to the disturbance of glutaminergic transmissions observed in exposed neurons.*

### Lexique

**β-caténine** : protéine jouant un rôle central dans la voie Wnt. Son accumulation nucléaire détermine la réponse transcriptionnelle. Elle forme un complexe avec les facteurs de transcription TCF/LEF et active les gènes cibles de la voie Wnt comme la cycline D1 ou la connexine 43.

**CRMP3** : protéine qui appartient aux protéines cytosoliques CRMPs (Collapsin response mediator proteins) principalement exprimées dans le cerveau, jouant un rôle essentiel dans la croissance des neurites. La protéine CRMP3 est connue pour être exprimée lors du développement du cerveau, notamment lors de la formation de l'hippocampe.

**Cycline D1** : protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Pendant, le cycle cellulaire, les cyclines interagissent avec leurs protéines kinases cycline-dépendantes (Cdk) spécifiques afin de former des complexes qui déclenchent la progression de la cellule dans le cycle cellulaire.

**Dvl** : Disheveled ou protéine cytoplasmique qui après fixation du ligand Wnt sur son récepteur, recrute le complexe de dégradation et empêche donc la phosphorylation de la β-caténine.

**Epines dendritiques** : petites protrusions au niveau des dendrites de certains neurones, sites de réception et d'intégration de signaux synaptiques des axones des neurones pré-synaptiques.

**ERO** : espèces réactives de l'oxygène.

**ErbB4** : protéine essentielle pour le développement neuronal. Cette protéine interagit avec PSD95 ou densité post

synaptique (PSD) qui est une protéine présente au niveau des densités postsynaptiques des neurones. Cette dernière se lie à un ou plusieurs sous-types de récepteurs ionotropiques du glutamate.

**Glutamate** : neurotransmetteur exciteur majeur associé à l'apprentissage et la mémoire. Il serait associé à la maladie d'Alzheimer.

**GSK3 $\beta$**  : protéine faisant partie d'un complexe protéique avec axine et APC, qui assure la dégradation de la  $\beta$ -caténine et donc empêche sa translocation nucléaire, bloquant la voie Wnt canonique.

**ICP** : technique analytique à plasma induit (ICP, Inductively Coupled Plasma) mesure quantitativement la teneur en éléments d'un matériau.

**KIF13** : protéine impliquée dans le transport de la sous-unité NR2B du récepteur N-méthyl-D-aspartate. Ceci est nécessaire pour la transmission synaptique ou l'apprentissage.

**LDH** : la lactate-déshydrogénase (LDH) est sécrétée dans le milieu de culture à partir de cellules endommagées et est un marqueur biologique de la cytotoxicité

**MAP2** : protéine du cytosquelette, spécifique aux neurones, qui est utilisée comme marqueur du phénotype neuronal. Elle est impliquée dans l'assemblage des microtubules.

**MKLP-1** : mammalian kinesin-like protein-1, protéine responsable de la répartition non uniforme des microtubules dans la dendrite et du transport des microtubules.

**MTT** : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium. Réactif présent dans un test de cytotoxicité basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale. La succinate déshydrogénase mitochondriale réduit le MTT en formazan dans les cellules vivantes actives.

**NAC** : N-acétylcystéine, un précurseur de glutathion qui permet un effet anti-oxydant.

**Neurites** : prolongement cytoplasmique neuronal qui donne à termes soit un axone soit une dendrite. Lors de la croissance, les neurites correspondent aux excroissances partant du corps neuronal et qui vont se différencier par la suite en dendrites ou axones.

**NMDA** (N-méthyl-D-aspartate) : récepteur ionotropique du glutamate, principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Ce récepteur-canal s'ouvre lors de la fixation du glutamate et laisse ensuite entrer les ions Na<sup>+</sup> et surtout Ca<sup>2+</sup>. Ces récepteurs du glutamate assurent le signal entre le neurone pré-synaptique et post-synaptique. Une activation excessive de ce récepteur peut conduire à une dégénérescence neuronale.

**Taille** : la taille primaire correspond à la taille des nanoparticules originelles. La distribution de taille reflète taille primaire et secondaire, c'est-à-dire résulte soit de l'agrégation des nanoparticules entre elles, soit des interactions avec les protéines du milieu de culture.

**TEM** : Transmission Electron Microscopy ou microscopie électronique en transmission, technique utilisant un faisceau d'électrons pour mettre un échantillon en image. Cette technique permet des hautes résolutions d'image.

**Wnt** : protéines qui constituent une grande famille de glycoprotéines, qui jouent un rôle dans le développement embryonnaire mais aussi dans le renouvellement des tissus adultes.

**Wnt3a** : ligand de la voie canonique Wnt/  $\beta$ -caténine.

**Wnt canonique** : les ligands se lient aux récepteurs Fizzled et agissent pour initier différentes voies de transduction. L'association ligand récepteur stimule une cascade d'événements moléculaires qui conduira à l'accumulation de la  $\beta$ -caténine.

**Wnt non canonique** : il existe deux voies non canoniques. Ces voies sont activées après qu'un ligand Wnt non-canonique tel que Wnt-5a se lie à un récepteur Wnt couplé à des corécepteurs de la voie non-canonique. Cela déclenche la voie Wnt/PKC-Ca<sup>2+</sup> et la voie Wnt/PCP. La voie calcique induit une série de réaction aboutissant à l'accumulation de calcium intracellulaire. Dans la voie de polarité planaire (PCP), Wnt se fixe au récepteur pour former des complexes avec RhoA, Rac1 ou JNK pour stabiliser le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules.

## Publications de référence

- 1 **Hattori K.** et al. (2017). Exposure to nano-size titanium dioxide causes oxidative damages in human mesothelial cells: The crystal form rather than size of particle contributes to cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.*, 492(2) : p.218-223.
- 2 **Jain AK.** et al. (2017). 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*, 105 : p.127-139.
- 3 **Uboldi C.** et al. (2016). Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicol In Vitro*, 31 : p.137-45.
- 4 **Sweeney S.** et al. (2015). Nano-titanium dioxide bioreactivity with human alveolar type-I-like epithelial cells: Investigating crystalline phase as a critical determinant. *Nanotoxicology*, vol.9 (4) : p.482-92.
- 5 **Wang JX.** et al. (2008). Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology*, 254 : p.82-90.
- 6 **Wang JX.** et al. (2008). Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the anatase, rutile crystal phases. *Toxicol Lett.*, 183 : p.72-80.
- 7 **Ze X.** et al. (2016). TiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced neurotoxicity may be involved in dysfunction of glutamate metabolism and its receptor expression in mice. *Environ Toxicol.*, 31 (6) : p.655-62.
- 8 **Wright C.** et al. (2017). Effects of titanium dioxide nanoparticles on human keratinocytes. *Drug Chem Toxicol.*, 40 (1) : p.90-100.
- 9 **Funato Y.** et al. (2010). Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin. *Free Radic Res.*, 44 (4) : p.379-88.

10 **Yi H.** et al. (2016). Silica Nanoparticles Target a Wnt Signal Transducer for Degradation and Impair Embryonic Development in Zebrafish. *Theranostics*, 6 (11) : p.1810-20.

### Revue de la littérature

**Masuda T.**, Ishitani T. (2017). Context-dependent regulation of the  $\beta$ -catenin transcriptional complex supports diverse functions of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Biochem*, 161 (1) : p.9-17.

**Song B.**, Zhou T., Yang W., et al. (2016). Contribution of oxidative stress to TiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol*, 48 : p.130-140.

**Song B.**, Zhang Y., Liu J., et al. (2016). Unraveling the neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: focusing on molecular mechanisms. *Beilstein J Nanotechnol*, 7 : p.645-54

**Xiao Q.**, Chen Z., Jin X. et al. (2017). The many postures of noncanonical Wnt signaling in development and diseases. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93 : p.359-369.

### Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt