HAL
open science

Toxicité des nanoparticules : cas des nanotubes de carbone

Dan Elgrabli, Ghislaine Lacroix

To cite this version:

Dan Elgrabli, Ghislaine Lacroix. Toxicité des nanoparticules : cas des nanotubes de carbone. 8. Congrès International pluridisciplinaire QUALITA 2009, Mar 2009, Besançon, France. pp.NC. ineris-00973334

HAL Id: ineris-00973334

https://ineris.hal.science/ineris-00973334

Submitted on 4 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

TOXICITE DES NANOPARTICULES : CAS DES NANOTUBES DE CARBONE

ELGRABLI Dan, LACROIX Ghislaine

INERIS, Parc technologique Alata, 60550 Verneuil en Halatte, France
Tel : 03.44.55.67.90, E-mail : dan.elgrabli@ineris.fr

Résumé :

Les nanotubes de carbone (NTC) sont difficilement détectables dans les matrices biologiques. Ceci rend l'étude de leur toxicité et de leur biodistribution plus difficile. Lors de ce travail, nous avons étudié, dans un premier temps, l'effet de l'albumine sérique de veau (BSA) sur la dispersion des NTC puis dans un second temps, la toxicité, la biodistribution ainsi que la clairance d'un NTC multi-feuillet (MWCNT) chez le rat en utilisant le nickel, une impureté métallique présente dans le nanotube étudié. Après une unique instillation intratrachéale de 100 µg de MWCNT, nos résultats ne montrent ni inflammation, ni lésions pulmonaires, ni modifications des paramètres physiologiques pulmonaires. De plus, l'absence de passage de la barrière alvéolo-capillaire et la mise en place d'un long mécanisme de clairance ont été observées dans le poumon. Afin de mieux comprendre ce mécanisme et à l'aide de la microscopie electronique et de la spectroscopie infrarouge, nous avons montré que les MWCNT sont chimiquement modifiés et sont clivés dans le poumon. Ces résultats, ainsi que l'étude de la phagocytose des MWCNT et de l'apoptose des macrophages alvéolaires, ont permis d'émettre l'hypothèse d'un mécanisme de clairance selon laquelle l'élimination des MWCNT dans le poumon serait liée à la phagocytose, l'apoptose, la dégradation de MWCNT par les macrophages alvéolaires puis la phagocytose de cellules apoptotiques.

Abstract:

Constituted only by carbon atoms, carbon nanotubes (CNT) are hydrophobic and hardly detectable in biological tissues. These properties make biokinetics and toxicology studies more complex. In this work, we propose to study the effect of bovine serum albumin as a dispersing agent for CNT. The toxicological effect of a multi walled CNT (MWCNT) and a method to investigate the biopersistance of CNT in organism, based on detection of nickel, a metallic impurity present in the MWCNT we investigated were then analyses. Our results, in rats that received 100 µg of MWCNT by a unique intratracheal instillation, reveal that MWCNT do not induce histopathological lesions, modifications of physiological pulmonary parameters and inflammation. Moreover, MWCNT do not significantly cross the pulmonary barrier and can be eliminated by a slow mechanism. Using electonic microscopy and infrared spectroscopy, we showed that MWCNT may be cleaved and chemically modified in the lung. Analyses of MWCNT lung clearance mechanism lead us to propose a hypothesis based on the phagocytosis, apoptosis of alveolar macrophages, possible degradation of MWCNT by alveolar macrophages, and elimination of apoptotic cells.

Mots clés : Nanotube de carbone, poumon, apoptose, inflammation, phagocytose, rat.

Keywords : Carbon nanotube, lung, apoptosis, inflammation, phagocytosis, rat

1. Introduction

1.1. Définitions et généralités

Il n'existe pas de définition internationale commune de ce qu'est une nanoparticule, mais un extrait du document PAS71 développé au Royaume-Uni mentionne qu'« une nanoparticule est un corps ayant une dimension de l'ordre de 100 nm ou moins » (UK Department of Trade and Industry and British Standards Institution). Cependant d'autres sources définissent les nanoparticules (NP) comme étant constituées

d'atomes, de molécules qui comportent deux ou trois dimensions pouvant mesurer entre 1 et 100 nanomètres (Office québecois de la langue française). Au sein de cette famille, il est important de distinguer les particules ultra fines (PUF) d'origine naturelle ou anthropique dans l'environnement et les nanomatériaux manufacturés issus des nanotechnologies. Les nanotechnologies peuvent être définies comme l'ensemble des études des procédés de fabrication et de manipulation de structures, de dispositifs et de systèmes matériels à l'échelle du nanomètre (nm). Il existe une grande diversité de NP variant de par leur taille, leur forme, leur nature chimique et leurs propriétés physiques. La faible taille des NP leur confère des propriétés physico-chimiques particulières répondant aux lois de la mécanique quantique qui diffèrent de celles observées sur ces mêmes particules à plus grande échelle. Lors de ces travaux, nous appellerons nanoparticules, les particules manufacturées produites par les nanotechnologies en opposition aux PUF d'origine naturelle et/ou anthropique se retrouvant mélangées dans l'atmosphère de façon non intentionnelle [Elgrabli, 2007]. Parmi les NP, on distingue un grand nombre de familles dont les nano objets , les métaux, les semi-conducteurs, les oxydes métalliques, les polymères composites, les céramiques, les nanosphères, les fils, les aiguilles, les tubes, les molécules (fullerènes) simples et complexes, les agrégats moléculaires ou atomiques non traités ou enrobés (Comité français de la prévention et de la précaution). Toutes ces particules, associées à leurs propriétés particulières, vont permettre d'envisager le développement d'un grand nombre de nouveaux produits.

1.2. Les nanoparticules dans la société

Les propriétés particulières des NP expliquent l'engouement accru, ces dernières années, au niveau mondial. Nous avons pu observer un investissement de plus en plus grand de la part de nombreux pays. Les financements gouvernementaux alloués à la nano-recherche sont ainsi passés d'un peu moins de 500 millions de dollars en 1997 à plus de 3,5 milliards de dollars en 2004 [Service, 2004]. Si ces particules suscitent une telle attention, c'est en particulier parce que leur utilisation est envisagée dans divers secteurs industriels tels que l'électronique, l'aéronautique, la cosmétique, la recherche ou encore la médecine… A l'heure actuelle sur le marché européen, plus de 35 applications utilisent des NP. Il s'agit de textiles insalissables recouverts d'une pellicule de nanoparticules d'argent, de verres autonettoyants sur lesquels ont été déposées des couches minces d'oxyde de titane, de nanofilms couvrant les cabines de douche, des éviers, des carrosseries, de dentifrices au nanophosphate de calcium qui comblent les minuscules fissures des dents, de produits antisolaires au dioxyde de titane, rouges à lèvres à l'oxyde de zinc pour améliorer la tenue, vernis à ongles enrichis en oxyde de zirconium… Cependant, l'utilisation des NP à grande échelle nécessite de prendre des précautions. Par exemple, en mars 2006, le produit ménager « MagicNano » vendu en aérosol comme vitrifiant des surfaces de verre et de céramique a provoqué des détresses respiratoires chez 110 personnes dont 6 durent être hospitalisées. C'est l'extrême finesse des gouttelettes générées par le propulseur et les produits chimiques qu'elles contenaient qui ont causé ces troubles (German Federal Institute for Risk Assessment). Même si les NP ne sont finalement pas à l'origine des effets néfastes de ce produit, cet événement a souligné combien il est difficile aujourd'hui de caractériser les nanomatériaux. La forte publicité faite autour de cet événement souligne aussi les inquiétudes du public face à ces technologies du futur. Lors du Grenelle de l'environnement, il a été décidé de demander aux pouvoirs publics de réaliser un bilan coûts/avantages systématique de la mise sur le marché de produits contenant des nanoparticules ou nanomatériaux, soulignant ainsi la volonté d'instaurer un principe de précaution face aux NP. A partir des résultats des études en cours, des dispositions seront prises pour renforcer l'information et la protection des salariés et de la population [Maraninchi et Grimfeld, 2008].

2. Toxicité des nanotubes de carbone

Les voies classiques de pénétration d'un toxique dans l'organisme (cutanée, orale, respiratoire et parentérale) s'appliquent aux NTC.

2.1 Les déterminants physiques influençant la toxicité des nanotubes de carbone

2.1.1. La surface spécifique

En raison de leur faible taille et de leur structure tubulaire, les NTC voient leur ratio surface/masse augmenter. Ce ratio caractérise ce que l'on appelle la surface spécifique. Or, plus la surface spécifique augmente, plus le nombre d'atomes en contact avec l'extérieur et possédant une activité toxique potentielle sur le milieu biologique augmente [Warheit, 2004]. Bien que négligeable pour les études toxicologiques des particules micrométriques, ce paramètre est indispensable lors de l'étude de la toxicologie des nanoparticules. A ce jour, il n'existe aucune étude montrant le rôle de la surface spécifique dans la toxicité des NTC. Néanmoins, plusieurs études portant sur d'autres types de nanoparticules illustrent l'importance de considérer ce paramètre en nanotoxicologie. Il a ainsi été montré que l'or, métal réputé pour être chimiquement stable face à l'oxydation, était capable de combustion spontanée dans sa forme nanométrique [Donaldson et Tran, 2002]. De plus, l'étude de la toxicité des particules nanométriques de TiO_2 et de $BaSO_4$ dont la surface spécifique est différente, a montré un effet inflammatoire plus important du TiO_2 suite à une expositon chronique de rats par inhalation. Or, ramenés à l'activité spécifique, les effets inflammatoires constatés sont identiques pour les 2 particules [Tran *et al.*, 2000].

2.1.2. L'état d'agglomération des nanotubes de carbone

Des données contradictoires ont été publiées concernant l'état d'agglomération des NTC. Il a été montré *in vitro*, sur des cellules de mésothéliomes (MSTO-211H), à des doses de 7,5 à 30 µg de SWCNT, qu'une augmentation de l'agglomération des NTC s'accompagnait d'une augmentation de la toxicité [Wick *et al.*, 2007]. Par ailleurs, il a également été montré qu'une augmentation de la dispersion conduisait à une augmentation de la toxicité in vivo, suite à une instillation intratrachéale (IT) de 10 µg de SWCNT chez des souris C57BL6 [Mercer *et al.*, 2007]. Ces résultats laissent supposer la variabilité toxicologique de chaque type de NTC et imposent la réalisation d'études spécifiques de chaque NTC.

2.1.3. Les contaminants métalliques

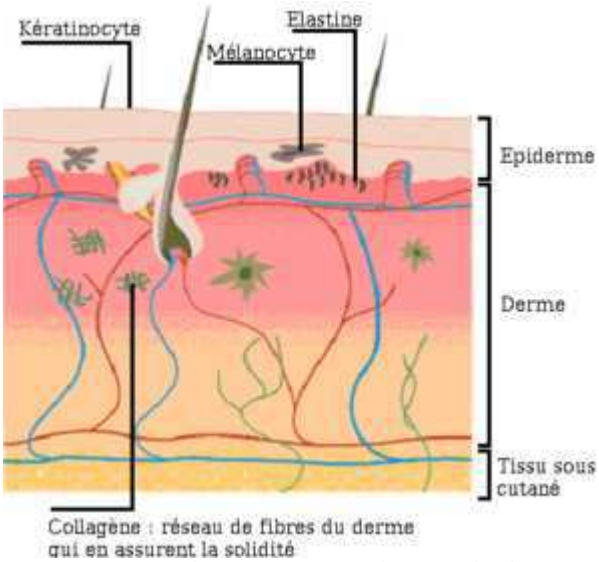
Comme nous l'avons vu précédemment, la production des NTC nécessite l'utilisation de catalyseurs métalliques tels que le nickel, le cobalt ou encore le fer qui perdurent à l'état de traces dans les NTC. Or ces métaux possèdent des effets toxiques propres. Le fer est connu comme générateur d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables d'induire un stress oxydant. Le nickel modifie l'expression du gène codant pour la protéine HIF1α, un facteur de transcription intervenant dans la régulation de gènes de l'inflammation et de l'apoptose [Kaczmarek *et al.*, 2007] Toutes les études portant sur la toxicité des NTC doivent donc tenir compte de la nature de son catalyseur métalique et de son degré de pureté. Aujourd'hui, il n'est pas possible d'obtenir des NTC purs en supprimant toute trace de catalyseurs. Il est donc intéressant d'identifier le rôle éventuel de ces métaux dans la toxicité potentielle des NTC.

2.1.4. La longueur des nanotubes de carbone

Enfin, la longueur des NTC ne peut être ignorée. En effet, suite à l'IT de 0,5 mg de MWCNT par rat, Muller et al [2005] ont montré que des NTC dont la longueur est plus importante (0,7 vs 6 µm) sont plus difficilement éliminés. Cependant, les NTC de faible taille induisent en plus forte quantité l'expression de marqueurs de l'inflammation *in vitro*, sur une culture primaire de macrophages péritonéaux (TNFα induit 2,5 fois plus en présence de 50 µg de nanotubes de plus faible taille) [Muller *et al.*, 2005]. Associée à ces résultats, une seconde étude menée par Poland et al. [2008] a montré, suite à une injection intrapéritonéale de 50 µg/souris de fibres de MWCNT de taille variable, que seules les souris exposées à de longues fibres (groupe 1 : longueur moyenne de 13 µm; groupe 2 : longueur maximale de 56 µm) de MWCNT présentaient une augmentation du nombre de cellules proinflammatoires après 24h ainsi qu'une formation de granulomes après 7 jours. L'ensemble de ces résultats reflètent encore l'importance de tenir compte de ce paramètre dans les études de toxicité des NTC.

2.2 Toxicité des nanotubes de carbone suite à un contact cutané

La peau constitue une barrière naturelle entre l'intérieur de l'organisme et le milieu extérieur (figure 1). Elle limite ainsi l'entrée d'agents étrangers tels que les virus, les bactéries ou les polluants. Cette "barrière protectrice" n'est toutefois pas absolue, elle est perméable à pratiquement toutes les substances ; seul le degré de perméabilité varie. Il est lié principalement à l'état physiologique de la peau, aux propriétés physico-chimiques des composés dont elle est supposée restreindre l'entrée et à la nature du véhicule (liquide, air ambiant...) par lequel ces substances sont amenées au contact de la peau. Afin de mieux définir la toxicité d'un agent étranger, et en particulier des NTC, il est nécessaire de connaître le devenir de ces particules au niveau cutané et plus précisément, de savoir si l'on va observer un passage transcutané. Plusieurs questions se posent. Quelle va être la fraction de la dose appliquée réellement absorbée ? Quelle sera la disponibilité de cette fraction dans l'exercice d'une activité toxique locale et/ou systémique ? Quelle sera la concentration localisée dans les structures cutanées ou dans les tissus plus profonds ? Existe-t-il un mécanisme de clairance épidermique et/ou dermique ou observera-t-on de l'accumulation dans les structures cutanées profondes.



(http://fr.wikibooks.org/wiki/Effets_des_rayonnements_%C3%A9lectromagn%C3%A9tiques_sur_le_vivant)

***Figure 1** : Représentation schématique de la peau vue en coupe.*

Les NTC sont hydrophobes et par conséquent, ils sont soupçonnés de pouvoir traverser les barrières biologiques et notamment la peau. Les études *in vitro,* réalisées sur la toxicité cutanée des SWCNT fonctionnalisés par de l'acide 6-aminohexanoique (AHA-SWCNT), ont montré qu'après 24h, des concentrations comprises entre 5.10^{-5} et 5.10^{-2} mg/ml entraînent une augmentation de la mortalité de kératinocytes humains (HEK). Ces lignées cellulaires présentent également une induction de l'expression de marqueurs de l'inflammation, l'IL-6 et l'IL-8, après 24 et 48h de traitement par 0,05 mg/ml de AHA-SWCNT [Zhang *et al.*, 2007]. Au niveau structural et à l'aide de la microscopie électronique à transmission (MET), la formation de vacuoles a été observée au sein du cytoplasme des cellules HEK à cette même dose après 24h [Zhang *et al.*, 2007]. Plusieurs études *in vitro* ont montré des effets irritants induits par les NTC. Par exemple, chez des cellules immortalisées d'épiderme humain (HaCaT), une induction de stress oxydant et une diminution du taux de glutathion et de vitamine E ont été notées suite au traitement par 0,06 à 0,24 mg/ml de SWCNT non modifiés pendant 2 à 18h [Shvedova *et al.*, 2003]. Comme pour les SWCNT, une augmentation de la mortalité des cellules HEK et de l'expression de l'IL8 a également été décrite pour des doses allant de 0,1 à 0,4 mg/ml de MWCNT [Monteiro-Riviere *et al.*, 2005]. Cependant, ces résultats ont été obtenus à partir de cellules immortalisées et il a été montré qu'il existe des différences significatives entre les effets observés sur des cellules immortalisées et des cultures primaires de kératinocytes. En effet, suite à une exposition de 0,1% de carburant, Allen et al. [2001] ont observé une induction de l'expression de l'IL8 sans variation de l'expression du TNFα sur des kératinicytes porcins en culture primaire. Cependant, ils ont également observés une inhibition de

l'expression de l'IL8 et une induction de l'expression du TNFα sur une ligné cellulaire de kératinocytes porcins (MSK3877) [Allen *et al.*, 2001]. Par ailleurs, Monteiro-Riviere et al [2005] ont traité des cellules HEK par 0,1 à 0,4 mg/ml de MWCNT et ont également observé la présence de NTC au sein de vacuoles cytoplasmiques ainsi que l'augmentation de l'expression de l'IL8 [Monteiro-Riviere et al., 2005]. Malgré l'augmentation croissante du nombre de publications concernant la toxicité des NTC, peu de choses sont connues sur la toxicité des ces particules au niveau cutané. Il semblerait que les NTC soient capables d'induire l'expression de l'IL-8 se traduisant par une irritation mais soient également capables d'entrer au sein du cytoplasme cellulaire dans des vacuoles. Il reste donc à identifier si ces phénomènes ont bien lieu *in vivo* et à déterminer si la présence des NTC dans les vacuoles cellulaires représente un moyen de passage de la barrière cutané. Un premier élément de réponse a cependant été apporté suite à 2 études *in vivo* chez le rat dans lesquelles les auteurs ont déposé des implants de NTC derrière la peau, mimant ainsi un passage cutané. Ni nécrose tissulaire ni inflammation ont été notées. Cependant les auteurs ont observé la formation de granulomes [Sato *et al.*, 2005 ; Yokoyama *et al.*, 2005].

2.3 Toxicité des nanotubes de carbone suite à une ingestion ou une injection intraveineuse

Suite à une ingestion, les toxiques sont conduits au niveau de l'estomac puis de l'intestin où ils sont, soit absorbés, soit éliminés dans les fèces. L'absorption dépend de la nature de la particule, de ses propriétés physico-chimiques mais également de la nature des interactions qu'elle effectue avec les protéines présentes. Comme lors de l'exposition par contact cutané, la toxicité des NTC induite par ingestion ou injection intraveineuse est très peu documentée. Seuls Wang et al [2004] ont montré que des SWCNT hydroxylés, marqués à l'^{125}I et injectés par gavage chez des souris étaient capables de se disperser dans l'estomac, les os et les reins, laissant supposer la capacité des SWCNT à être absorbés. Lors d'injection de NTC par voie intraveineuse, des résultats similaires ont été obtenus avec un SWCNT marqué par de l'^{111}In. Après injection chez des souris, les NTC ont été retrouvés dans les reins, le foie et la rate. De plus, l'étude pharmacocinétique a révélé une clairance rapide [McDevitt *et al.*, 2007 ; Singh *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2004]. Par ailleurs, la biodistribution des SWCNT non modifiés a aussi été réalisée lors d'une étude faisant appel à la fluorescence intrinsèque de cette particule. Comme lors des précédentes études, les auteurs ont montré une clairance rapide. 1h après injection, la totalité des NTC ont été éliminés du sang et se sont localisés au niveau du foie. Après 24h, une partie des NTC injectés a été détectée dans les reins, laissant supposer une clairance urinaire de la particule [Cherukuri *et al.*, 2004]. Ainsi, nous pouvons supposer que la fonctionnalisation des SWCNT entraîne également une modification de la distribution de celui-ci dans l'organisme. A ce jour, aucune étude n'a été publiée sur la toxicité des NTC au niveau des viscères abdominales (foie, reins, rate…). Seule une expérience préliminaire sur un faible nombre de souris a été réalisée sur 4 mois par l'équipe du professeur Gambhir de l'université de Stanford et a montré l'absence d'effet toxique des SWCNT au niveau du foie et de la rate. La présence de macrophages ayant phagocyté les NTC a également été notée au niveau du foie mais sans entraîner d'anomalie au niveau tissulaire [Gambhir, 2008]. Ces résultats forts intéressants, s'ils se confirment, laissent envisager l'utilisation des NTC dans des applications d'imagerie et de thérapies biomédicales.

2.4 Toxicité des nanotubes de carbone suite à sa pénétration via la voie respiratoire

Ce mode de pénétration représente la voie majeure d'exposition des travailleurs et de la population aux NTC. En effet, de par leur faible poids, les NTC peuvent aisément être mis en suspension dans l'air. Ainsi, toutes les étapes, de la production au stockage des NTC, peuvent conduire à l'exposition pulmonaire des manipulateurs. De même, le nettoyage, le perçage… de produits contenant des NTC au sein de leurs matrices sont sources d'exposition. Lors de la respiration, une fraction des particules présentes dans l'air va être inspirée puis expulsé par expiration. Les particules résiduelles seront au contact de la muqueuse pulmonaire ou passeront à travers la barrière alvéolo-capillaire pour se retrouver dans le sang. Afin de comprendre la toxicité induite par les NTC, il faut donc dans un premier temps analyser les différents paramètres intervenant dans cette toxicité et en particulier, les cibles histologiques et cytologiques des NTC. Ces cibles peuvent être identifiées en analysant les sites de dépôt des NTC puis dans un second temps les paramètres intrinsèques aux NTC capables d'induire des effets toxiques.

2.4.1 Dépôt des nanoparticules dans l'appareil respiratoire : Impact des propriétés physico-chimique sur la toxicité pulmonaire.

Un grand nombre de paramètres physico-chimiques influencent la pénétration et les interactions des nanoparticules avec les compartiments biologiques. Parmi ces paramètres, on distingue notamment le diamètre aérodynamique, la solubilité, la structure et la forme de la particule. Il a été montré que le diamètre aérodynamique d'une particule conditionnait étroitement sa pénétration au niveau de l'appareil respiratoire humain. Ainsi, des particules dont la taille est supérieure à 10 µm, sont arrêtées par la barrière nasale. Entre 2 et 10 µm, elles se déposent au niveau des voies aériennes supérieures et en dessous de 2 µm, elles atteignent le poumon profond (fraction alvéolaire) [Bair *et al.*, 2004]. La déposition des particules au niveau de l'appareil respiratoire à été étudiée à l'aide de particules marquées par des traceurs radioactifs (^{14}C ou ^{131}Ba) chez différentes espèces (rat, cobaye, souris, chien et homme). Ces travaux montrent que, quelle que soit l'espèce, une fraction des particules inhalées est piégée au niveau de l'appareil respiratoire (environ 15 à 20% pour un diamètre moyen de 150 nm), la plus grande partie se trouvant au niveau du poumon profond (entre 10 et 25% selon l'espèce). Lorsque que le diamètre des particules diminue (80 nm), la déposition totale augmente et ce, de façon plus importante au niveau trachéobronchique et alvéolaire. En effet, les premiers modèles de déposition, réalisés pour des nanoparticules, ont prévu une augmentation de la quantité de nanoparticules déposées au niveau trachéobronchique et alvéolaire par rapport à ceux qui ont été observé avec les particules fines [Bair *et al.*, 2004]. Ce modèle semble corréler avec les premiers résultats expérimentaux chez le rat qui montrent que la déposition de nanoparticules ^{192}Ir au niveau trachéobronchique et pulmonaire est de 49% et 28% pour des particules dont la taille est respectivement de 15 et 80 nm [Kreyling *et al.*, 2002].
Les NTC sont particulièrement hydrophobes et sont par conséquent présents sous forme d'agglomérats. Aucune étude sur la déposition des NTC dans l'appareil respiratoire n'a encore été publiée. Cependant, un autre modèle, étudiant l'inhalation des radionucléides, permet de tenir compte de la taille et de la solubilité des particules [CIPR, 1994]. Comme précédemment, ce modèle montre que, plus le diamètre des particules étudiées est petit, plus la pénétration au sein de l'arbre trachéobronchique est profonde. Par exemple, pour un diamètre de 0,1 µm, 29% des particules se déposent au niveau des alvéoles alors que, pour des particules de 5 µm, seulement 5% y parviennent. Si la taille est déterminante dans la localisation des particules au sein du tractus respiratoire, la solubilité joue un rôle important dans la clairance et le passage transmembranaire. En effet, plus la solubilité est importante, plus le transfert vers le sang sera rapide. A l'inverse, des composés peu solubles, tels que les NTC, ont un temps de séjour et d'épuration dans le tractus respiratoire qui sera plus long [CIPR, 1994]. En se basant sur la solubilité et la localisation des particules présentes au niveau du tractus respiratoire, un mécanisme d'épuration a pu être modélisé. Il montre que les particules ayant traversé l'épithélium sont transportées au niveau des ganglions lymphatiques régionaux par les voies lymphatiques exclusivement. Les particules présentes au niveau des bronches et des bronchioles sont dirigées vers le tractus digestif par remontée muco-ciliaire avec une vitesse plus au moins rapide pour être éliminées dans les fèces. Enfin, les particules présentes au niveau alvéolaire sont éliminées, soit via les voies aériennes supérieures, soit via les voies lymphatiques. Quelle que soit la localisation des particules, un passage vers le sang ne peut cependant pas être éliminé [CIPR, 1994]. Même si la déposition des NTC n'est pas encore documentée, Daigle et al. [2003] ont montré chez des patients sains que des particules ultrafines de carbone dont la taille est de 8,7 et 26 nm ont été retrouvées à hauteur de 66% et 80% respectivement au niveau des voies aériennes et du poumon profond au repos. Par ailleurs, ils observent également une augmentation significative du taux de déposition à 83 et 94% lorsque les sujets sont en exercice. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une importante fraction de la quantité de nanoparticules inhalées est capable de se déposer au niveau des voies aériennes trachéobronchique et alvéolaires et ce, de façon plus importante que pour des particules de plus grande taille [Daigle *et al.*, 2003]. Comme indiqué précédemment, les NTC forment partiellement des agglomérats de tailles variables dans les milieux aqueux et notamment biologiques [Cheng *et al.*, 1998]. Or, la taille des particules ou des agglomérats de particules joue un rôle clé dans sa localisation pulmonaire mais aussi dans sa toxicité [Oberdorster *et al.*, 2005]. Il est donc indispensable de bien caractériser la taille et l'état d'agglomération des nanoparticules étudiées.

2.4.2 Toxicité pulmonaire des nanotubes de carbone

Les premières études portant sur la toxicité des NTC *in vivo* ont été réalisées par IT. A de fortes doses, 0,1 à 0,5 mg/souris et 0,1 à 5 mg/rat, les auteurs ont montré l'apparition de granulomes au niveau des poumons des rongeurs [Lam *et al.*, 2004 ; Shvedova *et al.*, 2005 ; Warheit *et al.*, 2004] (figure 2). Les granulomes pulmonaires sont des structures anatomopathologiques constituées d'un amas de cellules immunitaires (lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles, macrophages) au niveau du parenchyme pulmonaire et généralement dus à une réaction localisée face à la présence d'un élément étranger. Ils sont généralement accompagnés de la sécrétion par les cellules immunitaires de cytokines inflammatoires.

Figure 2 *: Formation de granulome au niveau des alvéoles pulmonaires d'un rat traité par 0,5 mg de NTC (photographie INERIS).*

Dans le cas des NTC, les granulomes ont été décrits au niveau alvéolaire [Shvedova *et al.*, 2005 ; Warheit *et al.*, 2004] mais également au niveau de l'interstitium pulmonaire [Lam *et al.*, 2004] suite à 1 semaine d'exposition et pour une durée minimale de 3 mois [Warheit *et al.*, 2004]. Associé à ces granulomes se développe une réaction fibrosante dont les origines sont encore mal connues [Mangum *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2005]. Cette fibrose se caractérise par un épaississement du tissu alvéolaire en présence de SWCNT composé de collagène et d'élastine. Dès 60 jours, Muller et al. [2005] montrent une augmentation de la quantité de collagène suite au traitement par 0,5 mg/rat de MWCNT. Ces données sont appuyées par une augmentation du taux de TGFβ dès 7 jours suite au traitement de rats par 0,4 mg de SWCNT qui peut s'associer au développement du tissu fibrotique [Mangum *et al.*, 2006]. Enfin, il a également été observé qu'à la suite d'expositions de souris par 10 à 40 µg de SWCNT, des espèces activées de l'oxygène (ROS) étaient présentes dans le lavage bronchoalvéolaire (BAL) [Pulskamp *et al.*, 2007]. Si elles sont maîtrisées, les ROS ne présentent pas de grand danger. Cependant, leur surexpression conduit au développement d'un stress NTC oxydant qui peut être à l'origine d'une inflammation, de mutagenèses… et est considéré comme jouant un rôle dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardio-vasculaires ou encore l'arthrite rhumatoïde. Sur le plan inflammatoire, différents travaux ont montré une augmentation de neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et macrophages alvéolaires dans le LBA de souris traitées par 0,01 à 0,5 mg de SWCNT [Lam *et al.*, 2004 ; Shvedova *et al.*, 2005] ou de rats traités par 0,5 à 2 mg de MWCNT [Muller *et al.*, 2005]. Ces observations sont associées à l'augmentation de la quantité de cytokines proinflammatoires et notamment du TNFα, de l'IL1β et de l'IL8 [Muller *et al.*, 2005 ; Shvedova *et al.*, 2005]. *In vitro*, l'exposition de cellules épithéliales humaines A549 à des doses croissantes comprises entre 0 et 800 µg/ml de SWCNT montre une induction significative de la mortalité de 41 et 52% pour des doses de 400 et 800 µg/ml uniquement. Aux plus faibles doses, aucune cytotoxicité n'a été significativement notée [Davoren *et al.*, 2007]. Cependant, la sécrétion de cytokines de l'inflammation a aussi été quantifiée lors d'une exposition par 0,1 mg/ml de SWCNT d'une lignée de macrophages alvéolaires (RAW 264,7). Ainsi, les inductions de l'expression du TNFα, de l'IL1β et du TGFβ ont été montrées [Shvedova *et al.*, 2005]. Une question peut donc se poser : les effets inflammatoires observés sont-ils dus à la présence des NTC ou à l'état d'agglomération de ceux-ci ? Lors des études menées par IT, les NTC étudiés ont été dispersés dans du PBS [Shvedova *et al.*, 2005], du PBS ou du NaCl en presence de Tween 80 [Muller *et*

al., 2005 ; Warheit *et al.*, 2004] ou encore en présence de sérum [Lam *et al.*, 2004]. Cependant, ces méthodes ne permettent pas la production d'une grande majorité d'agglomérats respirables, c'est à dire de tailles inférieures à 10 µm. Récemment, deux études d'inhalation ont été effectuées suite à la production d'un aérosol contenant des agglomérats de NTC de tailles respirables [Li *et al.*, 2007 ; Mitchell *et al.*, 2007]. Mitchell et al. ont exposé, chaque jour, pendant 6h, des souris à des MWCNT. Après 7 et 14 jours, les auteurs n'ont pas observé de lésions pulmonaires telles que des granulomes ou de la fibrose pour des doses variant de 0,3 à 0,5 mg/m3, correspondant à des doses de 0,2 à 2,7 mg/kg de souris lors d'une IT. De même, la quantification des cytokines (IL-6, IL-10) de l'inflammation ainsi que l'analyse de la cellularité dans le LBA n'ont révélé aucun signe laissant présager la présence de processus inflammatoire. Ces résultats sont confortés par les travaux de Li et al. qui ont comparé les effets d'une exposition à un MWCNT par IT et inhalation. Comme lors de l'étude précédente, les auteurs n'ont observé aucun signe d'inflammation chez des souris ayant inhalé des MWCNT à la dose de 32 mg/m3 durant 8, 16 et 24 jours correspondant à une dose de 0,07, 0,14 et 0,21 mg/souris en IT. Seule la présence d'agglomérats de MWCNT et de cellules aux abords de ces agglomérats a été observée à proximité des parois des bronches sans entraîner d'inflammation. Une diminution de l'épaisseur des parois alvéolaires a également été rapportée suite à ce traitement. Par opposition, après administration par IT de ce même MWCNT, Li et al. [2007] ont montré la présence de lésions pulmonaires ainsi que l'expression de marqueurs de l'inflammation. Ces résultats, contradictoires avec ceux observés par inhalation, semblent démontrer que l'agglomération des NTC serait responsable de leur toxicité. Cette hypothèse, bien que probable, nécessite cependant de plus amples investigations. En effet, après l'IT de souris par des SWCNT dont le diamètre moyen des agglomérats est de 0,69 µm, ainsi qu'après l'inhalation de SWCNT à une dose de 5 mg/m3, (correspondant à des doses de 5 à 20 µg/souris par IT), une inflammation précoce et une augmentation du taux de collagène présent dans l'interstitium ont été rapportées [Mercer *et al.*, 2008 ; Shvedova *et al.*, 2008]. De plus, la formation de granulomes et la présence de stress oxydant ont été observées suite à l'inhalation de SWCNT [Shvedova *et al.*, 2008], mais pas lors de l'étude par IT d'agglomérats de faibles diamètres [Mercer *et al.*, 2008]. Ces résultats montrent encore la compléxité de l'étude de la toxicité des NTC et la nécessité de prendre en compte de multiples paramètres

Références

[Allen] Allen, Riviere, Monteiro-Riviere. Cytokine induction as a measure of cutaneous toxicity in primary and immortalized porcine keratinocytes exposed to jet fuels, and their relationship to normal human epidermal keratinocytes. Toxicology Letters **119,** 3, 209-217, 2001

[Bair] Bair, Bailey, Cross, Cuddihy, Gehr, James, Johnson, Masse, Roy, Stahlhofen. Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. International Commission on Radiological Protection **24,** 4, ICRP Publication 66, 2004.

[Cheng] Cheng, Li, Su, Pan, He, Sun, Dresselhaus. Large-scale and low-cost synthesis of single-walled carbon nanotubes by the catalytic pyrolysis of hydrocarbons. Applied Physics Letters **72,** 25, 3282-3284, 1998.

[Cherukuri] Cherukuri, Bachilo, Litovsky, Weisman. Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells. J Am Chem Soc **126,** 48, 15638-15639. 2004.

[CIPR] CIPR. Transfert à partir de la voie respiratoire (inhalation). http://www-carminceafr/. 1994.

[Daigle] Daigle, Chalupa, Gibb, Morrow, Oberdorster, Utell, Frampton. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. Inhal Toxicol **15,** 6, 539-552, 2003.

[Davoren] Davoren, Herzog, Casey, Cottineau, Chambers, Byrne, Lyng. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. Toxicol In Vitro **21,** 3, 438-448, 2007.

[Donaldson] Donaldson, Tran. Inflammation caused by particles and fibers. Inhal Toxicol **14,** 1, 5-27, 2002.

[Elgrabli] Elgrabli, Abella-Gallart, Aguerre-Chariol, Robidel, Rogerieux, Boczkowski, Lacroix. Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for in vivo and in vitro studies. Nanotoxicology **1,** 4, 266 – 278, 2007.

[Gambhir] Gambhir. Toxicity of liver and spleen induced by carbon nanotube. Pilote experiment. http://wwwnanowerkcom/spotlight/spotid=5398php, 2008.

[Kaczmarek] Kaczmarek, Timofeeva, Karaczyn, Malyguine, Kasprzak, Salnikow. The role of ascorbate in the modulation of HIF-1[alpha] protein and HIFdependent transcription by chromium(VI) and nickel(II). Free Radical Biology and Medicine **42,** 8, 1246-1257, 2007.

[Kreyling] Kreyling, Semmler, Erbe, Mayer, Takenaka, Schulz, Oberderster, Ziesenis. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A **65,** 20, 1513 – 1530, 2002.

[Lam] Lam, James, McCluskey, Hunter. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. Toxicol Sci **77,** 1, 126-134, 2004.

[Li] Li, Li, Xu, Cai, Liu, Li, Zhao, Li.Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. Environmental Toxicology **22,** 4, 415-421, 2007.

[Mangum] Mangum, Turpin, Antao-Menezes, Cesta, Bermudez, Bonner. Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages in situ. Part Fibre Toxicol **3**, 15, 2006.

[Maraninchi] Maraninchi, Grimfeld. Grenelle de l'environnement - Rapport du Groupe III - Instaurer un environnement respectueux de la santé. http://wwwlegrenelleenvironnementfr/ grenelle-environnement/IMG/pdf/G3_Synthese_Rapportpdf, 2008.

[McDevitt] McDevitt, Chattopadhyay, Kappel, Jaggi, Schiffman, Antczak, Njardarson, Brentjens, Scheinberg. Tumor Targeting with Antibody- Functionalized, Radiolabeled Carbon Nanotubes. J Nucl Med **48,** 7, 1180-1189, 2007.

[Mercer] Mercer, Scabilloni, Wang, Kisin, Murray, Schwegler-Berry, Shvedova, Castranova. Alteration of deposition pattern and pulmonary response as a result of improved dispersion of aspirated single-walled carbon nanotubes in a mouse model. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294,** 1, L87-97, 2008.

[Mercer] Mercer, Scabilloni, Wang, Schwegler, Berry, Shvedova, Castranova. Dispersion significantly enhances the pulmonary toxicity of single walled carbon nanotubes. Toxicologist **96,** 1, 231, 2007.

[Mitchell] Mitchell, Gao, Vander Wal, Gigliotti, Burchiel, McDonald. Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes. Toxicol Sci **28**, 28, 2007.

[Monteiro-Riviere] Monteiro-Riviere, Nemanich, Inman, Wang, Riviere, 2005. Multiwalled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. Toxicol Lett **155,** 3, 377-384.

[Muller] Muller, Huaux, Moreau, Misson, Heilier, Delos, Arras, Fonseca, Nagy, Lison. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Toxicology and Applied Pharmacology **207,** 3, 221-231. 2005.

[Oberdorster] Oberdorster, Maynard, Donaldson, Castranova, Fitzpatrick, Ausman, Carter, Karn, Kreyling, Lai, Olin, Monteiro-Riviere, Warheit, Yang, Group ArftIRFRSINTSW. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and Fibre Toxicology **2,** 1, 8, 2005.

[Poland] Poland, Duffin, Kinloch, Maynard, Wallace, Seaton, Stone, Brown, MacNee, Donaldson. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **3,** 7, 423-428, 2008.

[Pulskamp] Pulskamp, Diabate, Krug. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. Toxicol Lett **168,** 1, 58-74, 2007.

[Sato] Sato, Yokoyama, Shibata, Akimoto, Ogino, Nodasaka, Kohgo, Tamura, Akasaka, Uo, Motomiya, Jeyadevan, Ishiguro, Hatakeyama, Watari, Tohji. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. Mol Biosyst **1,** 2, 176-182, 2005.

[Service] Service. Nanotechnology grows up. Science **304**, 1732-1734, 2004.

[Shvedova] Shvedova, Castranova, Kisin, Schwegler-Berry, Murray, Gandelsman, Maynard, Baron. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. J Toxicol Environ Health A **66,** 20, 1909-1926, 2003.

[Shvedova] Shvedova, Kisin, Murray, Johnson, Gorelik, Arepalli, Hubbs, Mercer, Keohavong, Sussman, Jin, Yin, Stone, Chen, Deye, Maynard, Castranova, Baron and Kagan. Inhalation vs. aspiration of singlewalled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **295,** 4, L552-565, 2008.

[Shvedova] Shvedova, Kisin, Mercer, Murray, Johnson, Potapovich, Tyurina, Gorelik, Arepalli, Schwegler-Berry, Hubbs, Antonini, Evans, Ku, Ramsey, Maynard, Kagan, Castranova, Baron. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289,** 5, L698-708, 2005.

[Singh] Singh, Pantarotto, Lacerda, Pastorin, Klumpp, Prato, Bianco, Kostarelos. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. Proceedings of the National Academy of Sciences **103,** 9, 3357-3362, 2006.

[Tran] Tran, Buchanan, Cullen, Searl, Jones, Donaldson. Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence Of particle surface area on inflammation and clearance. Inhal Toxicol **12,** 12, 1113-1126, 2000.

[Wang] Wang, Wang, Deng, Sun, Shi, Gu, Liu, Zhaoc. Biodistribution of Carbon Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice. Journal of Nanoscience and Nanotechnology **4**, 1019-1024, 2004.

[Warheit] Warheit (2004). Nanoparticles: Health impacts? Materials Today **7,** 2, 32-35, 2004.

[Warheit] Warheit, Laurence, Reed, Roach, Reynolds, Webb. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. Toxicol Sci **77,** 1, 117-125, 2004.

[Wick] Wick, Manser, Limbach, Dettlaff-Weglikowska, Krumeich, Roth, Stark, Bruinink. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. Toxicol Lett **168,** 2, 121-131, 2007.

[Yokoyama] Yokoyama, Sato, Nodasaka, Yamamoto, Kawasaki, Shindoh, Kohgo, Akasaka, Uo, Watari, Tohji. Biological Behavior of Hat-Stacked Carbon Nanofibers in the Subcutaneous Tissue in Rats. Nano Lett **5,** 1, 157-161, 2005.

[Zhang] Zhang, Zeng, Barron, Monteiro-Riviere. Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes. Int J Toxicol **26,** 2, 103-113, 2007.