

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone

État de l'art

Février 2011

Édition scientifique





Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone

État de l'art

Février 2011

Édition scientifique

Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone

Etat de l'art

Février 2011

Présentation des intervenants

LISTE DES PERSONNES COMPETENTES

Alberto BIANCO – Directeur de recherches (CNRS) - Fonctionnalisation et Applications Biomédicales de Nanotubes de Carbone.

Dominique LISON – Professeur (Université catholique de Louvain) – Toxicologie.

Emmanuel FLAHAUT- Directeur de recherche (CNRS) - Chimie et Synthèse des Nanotubes de Carbone.

Jean-Yves BOTTERO - Directeur du CEREGE (CEREGE - CNRS Aix en Provence) - Ecotoxicologie.

Marie-Claude JAURAND - Directeur de recherches émérite (INSERM) – Toxicologie, pathologie tumorale.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Johanna FITE – Chargée de projets scientifiques – Anses.

Nathalie THIERIET – Chef de projets scientifiques – Anses.

Olivier MERCKEL – Chef de l'unité Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements – Anses.

Contribution scientifique

Johanna FITE – Chargée de projets scientifiques – Anses.

Secrétariat administratif

Sophia SADDOKI – Anses.

SOMMAIRE

Sommaire	3
Glossaire	6
1 Introduction.....	7
2 Méthodologie	8
3 Toxicité des nanotubes de carbone	9
3.1 Toxicocinétique.....	9
3.1.1 L'internalisation par les cellules	10
3.1.2 La distribution	10
3.1.2.1 Exposition par voie respiratoire.....	10
3.1.2.2 Exposition par ingestion.....	10
3.1.2.3 Exposition cutanée	10
3.1.2.4 Exposition par d'autres voies	11
3.1.3 Le métabolisme	11
3.1.4 La biopersistance.....	11
3.1.4.1 Exposition par voie respiratoire.....	11
3.1.4.2 Exposition par ingestion.....	12
3.1.4.3 Exposition cutanée	12
3.1.4.4 Exposition par d'autres voies	12
3.1.5 L'excrétion	13
3.1.5.1 Exposition par voie respiratoire.....	13
3.1.5.2 Exposition par ingestion.....	13
3.1.5.3 Exposition cutanée	13
3.1.5.4 Exposition par d'autres voies	13
Synthèse relative à la toxicocinétique des NTCs.....	15
3.2 Etudes in vitro	17
3.2.1 Cytotoxicité	17
3.2.1.1 Tests réalisés sur des modèles de cellules pulmonaires	17
3.2.1.2 Tests réalisés sur des modèles de cellules de la peau	19
3.2.1.3 Tests réalisés sur des modèles de cellules du système immunitaire	20
3.2.1.4 Tests réalisés sur d'autres modèles cellulaires.....	22
3.2.2 Génotoxicité, mutations géniques et chromosomiques.....	22
3.2.2.1 Tests réalisés sur des cellules procaryotes	22
3.2.2.2 Tests réalisés sur des cellules eucaryotes	25
3.2.3 Cancérogénicité : mécanismes in vitro	27
3.2.4 Immunotoxicité.....	28

3.2.5	Autres effets observés in vitro	28
Synthèse relative à la toxicité des NTCs <i>in vitro</i>		30
3.3	Etudes in vivo	33
3.3.1	Etude de la toxicité par voie respiratoire.....	33
3.3.1.1	Inflammation et lésions pulmonaires.....	33
3.3.1.1.1	Exposition par instillation	33
3.3.1.1.2	Exposition par aspiration pharyngée.....	35
3.3.1.1.3	Exposition par inhalation.....	36
3.3.1.2	Asthme bronchique, bronchiolite et pneumonie	38
3.3.1.2.1	Exposition par instillation intratrachéale.....	38
3.3.1.2.2	Exposition par inhalation.....	38
3.3.1.3	Effets sur le système cardio-vasculaire	39
3.3.1.3.1	Exposition par aspiration pharyngée.....	39
3.3.1.3.2	Exposition par instillation intratrachéale.....	39
3.3.1.3.3	Exposition par inhalation.....	39
3.3.1.4	Effets immulogiques et allergiques	39
3.3.1.5	Génotoxicité.....	40
3.3.1.5.1	Exposition par aspiration pharyngée et inhalation	40
3.3.1.5.2	Exposition par instillation intratrachéale.....	40
3.3.2	Etude de la toxicité par voie orale.....	40
3.3.2.1	Génotoxicité.....	40
3.3.3	Etude de la toxicité par voie cutanée	40
3.3.3.1	Cytotoxicité	41
3.3.3.2	Effets sur la peau et les muqueuses.....	41
3.3.3.3	Effets immunologiques et allergiques	42
3.3.4	Etude de la toxicité par d'autres voies	42
3.3.4.1	Reprotoxicité.....	42
3.3.4.2	Génotoxicité.....	42
3.3.4.3	Cancérogénicité : mésothéliomes.....	42
Synthèse relative à la toxicité des NTCs <i>in vivo</i>.....		44
3.4	Déterminants de la toxicité	49
Synthèse relative aux déterminants de la toxicité des NTCs.....		49
4 Ecotoxicité des nanotubes de carbone		50
4.1	Etude de l'écotoxicité des NTCs sur les micro-organismes	50
4.1.1	Stimulation ou inhibition de la croissance des micro-organismes.....	50
4.1.2	Effet cytotoxique : de la réduction de la mobilité à la mort cellulaire.....	50
4.2	Etude de l'écotoxicité des NTCs sur les végétaux.....	51

4.2.1	Cytotoxicité	51
4.2.2	Des résultats contradictoires sur la germination des graines et la croissance racinaire	51
4.3	Etude de l'écotoxicité des NTCs sur les organismes aquatiques	52
4.3.1	Pas d'effet génotoxique mis en évidence	52
4.3.2	Effets toxiques, réduction de la viabilité et augmentation de la mortalité ..	53
4.3.3	Effets reprotoxiques.....	54
4.3.4	Effets toxicologiques respiratoires, neuronaux et hépatiques divers	54
4.4	Etude de l'écotoxicité des NTCs sur les organismes terrestres	54
4.4.1	Ingestion des NTCs mais pas d'absorption dans les tissus démontrée	54
4.4.2	De la réduction de la mobilité à la mort cellulaire.....	54
4.4.3	Effets reprotoxiques.....	55
Synthèse relative à l'écotoxicité des NTCs		56
5 Etude de la dispersion des nanotubes de carbone dans l'environnement		58
5.1	Quantifier les NTCs dans un milieu naturel	58
5.2	Connaître la nature et la forme sous laquelle les NTCs seraient trouvés dans un milieu naturel	58
6 Conclusions		60
7 Références bibliographiques		61

Glossaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

Akt : *protein serine-threonine kinase*

AP-1 : *activator protein-1*

DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine

DTPA : Diéthylène triamine penta acide

DWCNT : *Double-walled carbon nanotube* (nanotube de carbone double-paroi)

IL : Interleukine

IRM : Imagerie par résonance magnétique

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LDH : Lactate Déshydrogénase

L_{moy} : Longueur moyenne

LOEC : *Lowest observed effect concentration* (plus petite concentration induisant un effet observé)

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes.

MET : Microscopie électronique en transmission

MWCNT: *Multi-walled carbon nanotube* (nanotube de carbone multi-paroi)

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B: *nuclear factor- κ B*.

NK (cells): *Natural killers* (cellules tueuses naturelles)

NOEC: *No observed effect concentration* (concentration sans effet observé)

NS : non spécifié

NTC : nanotube de carbone

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

\varnothing_{moy} : diamètre moyen

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase-1.

PBS: *Phosphate-buffered saline* (tampon phosphate salin)

ROS: *Reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène)

SDS : Sodium dodécyl *sulfate*

SPECT: *Single Photon Emission Computed Tomography* (tomographie d'émission à photon unique)

SWCNT: *Single-walled carbon nanotube* (nanotube de carbone mono-paroi)

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* (facteur de croissance transformant- β)

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α* (facteur de nécrose tumorale- α)

1 Introduction

Parmi les nombreux nanomatériaux existants, les nanotubes de carbone (NTCs) font partie d'une catégorie de matériaux à part tant leur potentiel d'application est vaste et leurs propriétés exceptionnelles.

Il est possible de décrire simplement la structure d'un nanotube de carbone comme étant un feuillet de graphène enroulé sur lui-même, formant un cylindre creux simple ou multi-parois (respectivement SWCNT: *single-walled carbon nanotube* ou MWCNT: *multi-walled carbon nanotube*), éventuellement fermé à ses extrémités par des demi-fullerènes¹ ou des structures plus complexes. Parmi les MWCNTs, les double-parois (DWCNTs pour *Double-Walled carbon NanoTubes*) sont identifiés distinctement en raison de leurs caractéristiques intermédiaires (morphologie, propriétés mécaniques et électroniques) entre celles des SWCNTs et celles des MWCNTs.

Le diamètre moyen (\varnothing_{moy}) des NTCs varie du nanomètre (SWCNT) à quelques dizaines de nanomètres (MWCNT) (inférieur à 100 nm) et leur longueur (L_{moy}) de quelques microns à quelques centaines de microns (pouvant atteindre le centimètre dans certains cas [Zheng *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2006]), leur conférant ainsi un facteur de forme (rapport longueur sur diamètre) extrêmement élevé ($10^3 - 10^5$).

Les NTCs ont des propriétés particulièrement intéressantes qui en font des additifs de choix pour les matériaux (dissipation électrostatique, renforcement mécanique), pour les revêtements (pour apporter des propriétés de conductivité électrique aux adhésifs et encres par exemple), pour l'énergie (ils améliorent le temps de vie des systèmes de stockage d'énergie en permettant un nombre de cycles charges/décharges plus important) et pour la catalyse. Les applications potentielles, dans le domaine du médical notamment, concernent différentes utilisations, telles que la vectorisation de médicaments ou l'imagerie.

Il existe une grande diversité de NTCs et leurs caractéristiques physico-chimiques (état d'agglomération et/ou d'agrégation, composition chimique, taille de particules et distribution, forme, solubilité / dispersabilité, surface spécifique, chimie de surface, densité surfacique de charge) varient selon leur origine, leur procédé de fabrication, les catalyseurs utilisés, *etc.*

La toxicité des NTCs est depuis peu étudiée avec pour preuve de nombreuses publications indiquant qu'ils constituent une source de préoccupations pour la santé humaine (*voir* § 3). En revanche, la bibliographie dénote incroyablement par ses lacunes au niveau de leur impact potentiel sur les écosystèmes et sur les espèces qui les peuplent. Or, il faut envisager la dissémination des NTCs dans l'environnement à chacune des étapes de leur cycle de vie (conception, production, utilisation et fin de vie de produits finis). Par conséquent, il est nécessaire d'en étudier les risques sur la composante biologique des milieux réceptacles et concentrateurs de pollution que sont le compartiment aquatique et le sol (*voir* § 4).

¹ **Fullerène** : molécule composée de 60 atomes de carbone attachés les uns aux autres, de la forme d'un ballon de football.

2 Méthodologie

L'identification des articles dans les revues avec comité de pairs et ayant trait à la toxicité et à l'écotoxicité des nanotubes de carbone a été réalisée à partir d'une analyse de la littérature scientifique à travers les approches couramment utilisées pour ce type de recherche, dans différentes bases de données (notamment PubMed et MedLine).

Afin de couvrir un spectre aussi large que possible, les mots-clés suivants ont été retenus : nanotubes, MWCNT, SWCNT, DWCNT, toxicity, ecotoxicity.

La littérature est couverte de façon la plus complète possible (mais non exhaustive) jusqu'à l'été 2010. Au total, un peu plus de 150 articles ont été étudiés, dont environ 2/3 relatifs à la toxicité des NTCs et 1/3 relatifs à leur écotoxicité. La très grande majorité (environ 95 %) de ces articles a été publiée entre 2004 et 2010.

Le contenu des différents articles, originaux ou de synthèse, a été résumé et des synthèses ont été rédigées pour chaque partie du rapport.

3 Toxicité des nanotubes de carbone

L'étude des effets biologiques des nanotubes de carbone promet d'être une tâche lourde et complexe, en raison de la diversité des caractéristiques (taille, forme, état de surface, fonctionnalisation², etc.) des nanotubes existants, qui peut influencer leurs effets biologiques.

L'étude de la toxicocinétique des NTCs (voir § 3.1) est une première étape indispensable pour connaître le devenir des NTCs dans l'organisme.

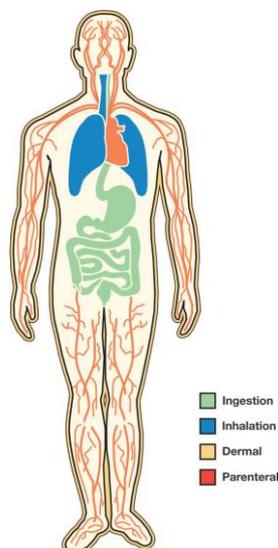
Ensuite, les études *in vitro* (voir § 3.2) sont une deuxième étape indispensable car particulièrement adaptées aux tests d'un très grand nombre de conditions. Elles sont idéales pour déterminer les mécanismes d'action au niveau cellulaire et moléculaire. Ces études ont l'avantage de pouvoir identifier les caractéristiques des nanoparticules pouvant avoir un rôle dans leurs effets sur l'homme et l'environnement.

Enfin, les études *in vivo* (voir § 3.3) permettent d'étudier les effets biologiques des nanotubes de carbone sur des organismes vivants (sur des rats, des souris ou des lapins notamment).

Afin d'étudier la toxicité des nanotubes de carbone, un peu plus d'une centaine d'articles scientifiques ont été pris en compte.

3.1 Toxicocinétique

Les NTCs peuvent pénétrer dans l'organisme via l'inhalation, l'ingestion, le contact cutané et, en cas d'applications biomédicales, la voie parentérale³ (voir Figure 1). Ainsi, la toxicité potentielle des NTCs peut s'exprimer au niveau des différents portails d'entrée dans l'organisme, tels que les poumons (voir études *in vivo* par voie respiratoire au § 3.3.1), l'appareil digestif (§ 3.3.2) et la peau (§ 3.3.3), ainsi que sur des sites éloignés.



Source : Stern, 2008.

Figure 1 : Voies d'exposition potentielles aux nanoparticules

² La **fonctionnalisation** consiste à greffer une fonction (citrate, thiols, phosphonates, tensioactifs, polymères, etc.) aux nanoparticules afin de leur conférer de nouvelles propriétés (dispersion en milieux aqueux et non aqueux, applications en imagerie médicale, etc.).

³ L'administration d'une substance faite au moyen d'une injection est appelée **voie parentérale**, en opposition à la voie entérale qui désigne l'administration faite par l'intermédiaire du tube digestif. Elle peut être intraveineuse, sous-cutanée, intradermique ou intramusculaire.

Une fois dans l'organisme, l'étude du devenir (internalisation, distribution, métabolisme, biopersistance et excrétion) des substances fait l'objet de la toxicocinétique.

3.1.1 L'internalisation par les cellules

Pantarotto *et al.* ont étudié le transport intracellulaire de SWCNTs (\varnothing_{moy} : 1 nm ; L_{moy} : 0,3-1 μm) fonctionnalisés (conjugués avec une sonde fluorescente ou une séquence peptidique) sur des fibroblastes⁴ humains et de souris *in vitro* (1 ; 5 et 10 μM). Ils ont démontré que ces particules pouvaient traverser la membrane cellulaire (par diffusion), s'accumuler dans la cellule et se retrouver dans le noyau de la cellule [Pantarotto *et al.*, 2004].

L'étude de Cherukuri *et al.* a montré que des nanotubes de carbone (\varnothing_{moy} : 1 nm ; L_{moy} : 1 μm) pouvaient être internalisés par les macrophages⁵ péritonéaux (par phagocytose) de la souris *in vitro* [Cherukuri *et al.*, 2004].

Dans une étude de Kam *et al.*, des SWCNTs (\varnothing_{moy} et L_{moy} non connus) et des SWCNTs conjugués à de la streptavidine (utilisée comme indicateur) ont été internalisés (par endocytose) dans des cellules humaines de leucémie aiguë promyélocytaire (HL60) et des cellules T (Jurkat) humaines [Kam *et al.*, 2004].

Monteiro-Riviere *et al.* ont retrouvé des MWCNTs (jusqu'à 3,6 μm de long) dans les vacuoles cytoplasmiques de kératinocytes humains *in vitro* et ont montré que ces particules provoquaient une diminution de la viabilité des cellules et une augmentation significative de l'expression d'un marqueur d'inflammation (interleukine-8). Les MWCNTs sont donc en mesure de pénétrer dans la cellule [Monteiro-Riviere *et al.*, 2005b].

3.1.2 La distribution

3.1.2.1 Exposition par voie respiratoire

Deng *et al.* ont exposé des souris par injection intratrachéale à 100 μg de [14C-aurine]- MWCNTs (\varnothing_{moy} : non connu ; L_{moy} : 110-600 nm). La distribution des MWCNTs dans l'organisme a été observée jusqu'à 28 jours après l'exposition. Les NTCs se sont principalement accumulés dans les poumons [Deng *et al.*, 2007].

3.1.2.2 Exposition par ingestion

Chez la souris, 3 h après administration par gavage (de 100 μL d'une solution à 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), les SWCNTs (\varnothing_{moy} : 1,4 nm ; L_{moy} : 340 μm) hydroxylés sont distribués dans la majorité des organes et tissus, à l'exception du cerveau [Wang *et al.*, 2004].

Dans l'étude de Deng (*précédemment citée au § 3.1.2.1*), les auteurs ont exposé des souris par gavage à 100 μg de [14C-aurine]- MWCNTs (\varnothing_{moy} : non connu ; L_{moy} : 110-600 nm). La distribution des MWCNTs dans l'organisme a été observée jusqu'à 24 h après l'exposition. Il a été observé que les MWCNTs transitaient dans l'estomac, puis rapidement vers l'intestin grêle et le gros intestin. Aucun passage dans la circulation sanguine n'a été observé [Deng *et al.*, 2007].

3.1.2.3 Exposition cutanée

Pas de donnée étudiée.

⁴ Un **fibroblaste** est une cellule du tissu conjonctif.

⁵ Les **macrophages** proviennent de la différenciation de leucocytes sanguins, les monocytes. Les monocytes et les macrophages sont des phagocytes (cellules capables de phagocytose). Ils participent à l'immunité.

3.1.2.4 Exposition par d'autres voies

Chez la souris, dans l'étude de Wang *et al.* (précédemment citée au § 3.1.2.2), 3 h après administration par voie intrapéritonéale (100 µL d'une solution de 15 µg/mL), les SWCNTs (\varnothing_{moy} : 1,4 nm ; L_{moy} : 340 µm) hydroxylés radiomarqués (à l'iode-125) sont distribués dans tout l'organisme, à l'exception du cerveau, ils traversent plusieurs compartiments et sont retenus dans les os. Cette distribution est similaire à celle obtenue par les autres voies utilisées (intraveineuse, sous-cutanée et gavage) [Wang *et al.*, 2004].

Chez le lapin, 24 h après injection intraveineuse (20 µg/kg de masse corporelle) de SWCNTs bruts (\varnothing_{moy} : 1 nm ; L_{moy} : 300 nm), Cherukuri *et al.* n'ont observé des concentrations significatives de SWCNTs que dans le foie (parmi les 12 organes analysés dont le cerveau, le cœur et les reins) [Cherukuri *et al.*, 2006].

Au contraire, dans une autre étude chez la souris exposée par injection intraveineuse (60 µg) à des SWCNTs (\varnothing_{moy} : 1 nm ; L_{moy} : 300-1 000 nm) radiomarqués (à l'indium-111) et fonctionnalisés avec du DTPA⁶ pour les solubiliser, les auteurs ont observé que les SWCNTs n'étaient retenus dans aucun organe du système réticulo-endothélial (foie, rate) au bout de 24 h [Singh *et al.*, 2006].

Dans l'étude de Deng (précédemment citée aux § 3.1.2.1 et 3.1.2.2), les auteurs ont exposé des souris par injection intraveineuse à 200 µg de [14C-aurine]- MWCNTs (\varnothing_{moy} : non connu ; L_{moy} : 110-600 nm). La distribution des MWCNTs dans l'organisme a été observée de 6 h jusqu'à 90 jours après l'exposition. Les auteurs ont observé que les MWCNTs s'accumulaient principalement dans le foie (80 % de la dose). Par ailleurs, 5 % des MWCNTs ont été retrouvés dans la rate et les poumons [Deng *et al.*, 2007].

Chez la souris, Wang *et al.* ont étudié la distribution de SWCNTs (\varnothing_{moy} : 1,4 nm ; L_{moy} : 340 nm) hydroxylés radiomarqués (à l'iode-131) dans l'organisme entre 2 mn et 1 h après injection intraveineuse et intrapéritonéale. Le mode d'injection avait peu d'influence sur la distribution. Dans les deux cas, 2 mn après l'injection, la radioactivité a été retrouvée dans tout le corps à l'exception du cerveau. Le foie, les reins, l'estomac et les poumons sont les organes cibles. La concentration en SWCNTs dans différents tissus (cœur, poumons, muscles) est corrélée avec la concentration dans le sang, montrant clairement que la circulation sanguine apporte les SWCNTs dans tout l'organisme [Wang *et al.*, 2008].

3.1.3 Le métabolisme

Pas de donnée identifiée.

3.1.4 La biopersistance

La biopersistance des particules solides dans l'organisme résulte de leur durabilité (c'est-à-dire leur capacité à résister à la solubilisation ou la dégradation chimique ou enzymatique) et de leur vitesse d'élimination par les processus biologiques (p. ex. épuration muco-ciliaire, prise en charge par les macrophages).

La biopersistance des matériaux dans les tissus biologiques constitue un élément important qui module leur potentiel toxique [Sanchez *et al.*, 2009].

3.1.4.1 Exposition par voie respiratoire

Muller *et al.* ont étudié la persistance des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 9,7 nm ; L_{moy} : 5,9 µm) et des MWCNTs broyés (\varnothing_{moy} : 11,3 nm ; L_{moy} : 0,7 µm) dans les poumons de rats exposés par instillation intratrachéale unique (0,5 ; 2 et 5 mg). À la plus faible dose (0,5 mg), 80 % des MWCNTs et 40 % des MWCNTs broyés ont été retrouvés dans les poumons 60 jours après l'administration. Les

⁶ DTPA : Diéthylène triamine penta acide.

auteurs concluent que les nanotubes de carbone sont persistants dans les poumons et que la cinétique de leur clairance⁷ est influencée par leur longueur [Muller *et al.*, 2005]. Toutefois, Donaldson *et al.* soulignent que les nanotubes étudiés par Muller sont nettement plus courts que les fibres minérales considérées comme longues et mesurant près de 20 µm [Donaldson *et al.*, 2006].

En utilisant le dosage du nickel (0,53 % de la masse totale des NTCs) présent dans les MWCNTs (\varnothing_{moy} : 20-50 nm ; L_{moy} : 0,5-2 µm), d'autres auteurs ont montré que les MWCNTs ne traversent pas significativement la barrière épithéliale pulmonaire mais sont toujours présents dans les poumons 6 mois après une administration intratrachéale chez le rat [Elgrabli *et al.*, 2008a].

En utilisant le dosage du cobalt présent dans les MWCNTs (Baytubes®) (\varnothing_{moy} : 10-16 nm ; L_{moy} : 200-1 000 µm ; surface : 253 m²/g), Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn ont rapporté une demi-vie d'élimination pulmonaire de 60 ou 140 jours chez le rat après une période d'inhalation par le nez de 6 h (respectivement 11 ou 241 mg/m³) [Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009].

Chez des rats, après 13 semaines d'inhalation par le nez (« nose-only ») d'un aérosol des mêmes MWCNTs micronisés (Baytubes®) (6 h/jour, 5 jours/semaine ; 0,1 ; 0,4 ; 1,5 et 6 mg/m³), Pauluhn a rapporté des demi-vies d'élimination respectivement de l'ordre de $t_{1/2}$ = 151, 350, 318, et 375 jours [Pauluhn 2010a].

Dans les études de Pauluhn, il est clair que la demi-vie d'élimination pulmonaire des MWCNTs dépend de la dose pulmonaire [Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009 ; Pauluhn 2010a]. Le ralentissement de la demi-vie d'élimination a été attribué au phénomène de « surcharge alvéolaire⁸ ». Selon les auteurs, le volume des MWCNTs est mieux corrélé au ralentissement de la demi-vie d'élimination de ces matériaux que la surface des MWCNTs. Pauluhn *et al.* attribuent aussi la toxicité de leur MWCNT à la surcharge des poumons.

3.1.4.2 Exposition par ingestion

Pas de donnée identifiée.

3.1.4.3 Exposition cutanée

Pas de donnée identifiée.

3.1.4.4 Exposition par d'autres voies

Dans l'étude de Deng (*précédemment citée au § 3.1.2.4*), les auteurs ont observé que les MWCNTs injectés par voie intraveineuse chez des souris s'accumulaient principalement dans le foie, persistant 28 jours sans être métabolisés et diminuant à 20 % de la dose initiale au bout de 3 mois post-administration [Deng *et al.*, 2007].

⁷ La **clairance** est la capacité d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à éliminer totalement une substance donnée d'un fluide (le sang, la lymphe, *etc.*).

⁸ Des expositions par inhalation répétées (à des MWCNTs) peuvent provoquer une **surcharge alvéolaire** qui est une conséquence de la diminution de l'élimination (de ces matériaux) dans le temps, associée à une augmentation de la rétention des particules. Les réactions de surcharge alvéolaire sont généralement considérées être consécutives à une surcharge des macrophages alvéolaires, un phénomène dépendant du volume (plutôt que de la masse) de particules accumulées dans les alvéoles. Il s'agit d'un phénomène expérimental propre au rat.

3.1.5 L'excrétion

3.1.5.1 Exposition par voie respiratoire

Dans l'étude de Deng sur les souris (cf. § 3.1.2.4), les MWCNTs injectés par voie intratrachéale et accumulés dans les poumons ont été éliminés graduellement, passant à 78 % de la concentration initiale 1 jour après l'exposition et à 20 % au bout de 28 jours [Deng *et al.*, 2007].

Chez le rat, les résultats de l'étude d'Elgrabli *et al.* (cf. § 3.1.4) suggèrent que les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans la clairance des MWCNTs des poumons [Elgrabli *et al.*, 2008a]. Ils seraient efficaces pour phagocyter les NTCs inhalés dont la longueur se situe en dessous de 15-20 µm (voir également § 3.1.1 sur la phagocytose des NTCs).

3.1.5.2 Exposition par ingestion

Dans l'étude de Deng sur des souris (cf. § 3.1.2.2) gavées avec des MWCNTs, 74 % des MWCNTs ont directement été excrétés dans les fèces 12 h après l'exposition [Deng *et al.*, 2007].

3.1.5.3 Exposition cutanée

Pas de donnée étudiée.

3.1.5.4 Exposition par d'autres voies

Lors de l'étude de Wang *et al.* (cf. § 3.1.2.2), 11 jours après exposition par la voie intrapéritonéale, environ 80 % des SWCNTs (Ø_{moy} : 1,4 nm ; L_{moy} : 340 µm) hydroxylés radiomarqués administrés avaient été excrétés, dont 94 % par l'urine et 6 % par les fèces [Wang *et al.*, 2004].

Après injection intraveineuse, les SWCNTs sont rapidement éliminés de la circulation sanguine par excrétion rénale (de SWCNTs intacts) avec un temps de demi-vie d'environ 3 h chez la souris [Singh *et al.* ; 2006].

De même, chez le lapin, 24 h après l'injection intraveineuse, la concentration sanguine en SWCNTs décroît de manière exponentielle avec un temps de demi-vie d'1 h [Cherukuri *et al.*, 2006].

Lacerda *et al.* ont montré avec des images obtenues au microscope électronique en transmission (MET) que des MWCNTs pouvaient être transloqués directement dans la capsule de Bowman⁹. La forme des NTCs et leur degré d'individualisation jouent un rôle essentiel dans leur transport *in vivo* et leur translocation. Les NTCs qui sont bien individualisés et « solubilisés » dans les milieux biologiques peuvent traverser le filtre glomérulaire¹⁰ et être excrétés dans l'urine [Lacerda *et al.*, 2008a].

Ces mêmes auteurs ont suivi *in vivo* par tomoscintigraphie¹¹ des MWCNTs fonctionnalisés avec du DTPA et radiomarqués avec de l'Indium-111 et administrés par voie intraveineuse à des souris. Ils ont montré que les nanotubes entraient dans la circulation sanguine systémique et qu'au bout de 5 mn, ils commençaient à traverser le système de filtration glomérulaire du rein et à se retrouver dans l'urine [Lacerda *et al.*, 2008b].

⁹ La **capsule de Bowman** contient le principal dispositif de filtration du néphron (unité structurale et fonctionnelle du rein), le glomérule. Le sang est apporté à la capsule de Bowman par l'artériole afférente. Dans la capsule, le sang est filtré à travers le glomérule puis sort par l'artériole efférente. Entretemps, l'eau et les déchets aqueux filtrés dans la capsule de Bowman pénètrent dans le tubule contourné proximal.

¹⁰ La **filtration glomérulaire** est la filtration du sang par le glomérule du rein, menant à la formation d'urine primitive.

¹¹ Synonyme de **tomoscintigraphie** : tomographie d'émission à photon unique. En anglais, *Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)*.

L'étude de Georgin *et al.* a montré qu'après injection intraveineuse (0,35 mg) de MWCNTs (\varnothing_{moy} : 40 nm ; L_{moy} : 10 μm) radiomarqués (au carbone-14), la clairance sanguine était rapide mais que les MWCNTs accumulés dans le foie (principalement) et les poumons sous forme d'agrégats étaient éliminés lentement de ces organes [Georgin *et al.*, 2009].

Enfin, Ruggiero *et al.* ont également étudié l'excrétion rénale de SWCNTs fonctionnalisés avec des groupes aminés (\varnothing_{moy} ~1 nm ; L_{moy} : 200-300 nm) après injection intraveineuse chez la souris. Ils ont montré que le produit (intact) était rapidement éliminé (avec un temps de demi-vie d'environ 6 mn) par le rein, par filtration glomérulaire avec réabsorption tubulaire¹² partielle (environ 15 % du produit était réabsorbé au bout de 20 mn) et translocation transitoire dans les noyaux des cellules tubulaires proximales. L'absorption directionnelle des nanotubes a été confirmée *in vitro* en utilisant des cellules tubulaires proximales humaines (HK-2) polarisées. Aucune sécrétion active impliquant des transporteurs n'a été mise en évidence. La modélisation mathématique de la diffusion a montré la tendance du flux à orienter les SWCNTs de cette taille à être éliminés via la filtration glomérulaire. Ces grosses structures (rapport longueur sur diamètre de 100 :1 à 500 :1) semblent donc être éliminées par le rein de manière similaire aux petites molécules [Ruggiero *et al.*, 2010].

¹² La **réabsorption tubulaire** consiste dans le passage d'une molécule de la lumière du néphron (unité structurale et fonctionnelle du rein) vers le sang. Elle peut se faire selon deux mécanismes : l'un actif et l'autre passif.

Synthèse relative à la toxicocinétique des NTCs

Les voies d'exposition potentielles aux nanoparticules sont l'inhalation, l'ingestion, le contact cutané et, en cas d'applications biomédicales, la voie parentérale. Une fois dans l'organisme, l'étude du devenir (internalisation, distribution, métabolisme, biopersistance et excrétion) des substances fait l'objet de la toxicocinétique.

L'internalisation par les cellules

Quatre articles étudiant l'internalisation des NTCs par les cellules ont été analysés [Pantarotto *et al.*, 2004 ; Cherukuri *et al.*, 2004 ; Kam *et al.*, 2004 ; Monteiro-Riviere *et al.*, 2005b].

Raffa *et al.* ont récemment proposé un schéma d'internalisation des NTCs, selon les paramètres qui modulent cette internalisation. D'après les données de la littérature, ces auteurs ont rapporté que les NTCs pouvaient pénétrer dans les cellules selon les différents mécanismes connus : phagocytose¹³, endocytose¹⁴ et diffusion¹⁵.

La phagocytose apparaît comme étant le chemin d'internalisation privilégié pour les NTCs en agrégats, en faisceaux, en paquets ou dispersés seuls lorsque leur longueur est supérieure à 1 µm.

L'endocytose semble être le mécanisme d'internalisation pour les nanotubes formant des structures supramoléculaires.

Enfin, la diffusion semble être le mécanisme d'internalisation privilégié pour les NTCs de taille inférieure à 1 µm qui ne forment pas de complexes supramoléculaires [Raffa *et al.*, 2010].

La distribution dans l'organisme

Sur les 5 articles concernant la distribution des NTCs dans l'organisme, 1 a étudié leur distribution après exposition par voie respiratoire [Deng *et al.*, 2007], 2 par ingestion [Wang *et al.*, 2004 ; Deng *et al.*, 2007] et tous ont étudié la distribution des NTCs après injection (par voie intraveineuse et intrapéritonéale).

Il en ressort que les NTCs sont distribués via la circulation sanguine dans tout l'organisme [Wang *et al.*, 2008], à l'exception du cerveau [Wang *et al.*, 2004 et 2008]. Ils peuvent s'accumuler principalement dans le foie [Cherukuri *et al.*, 2006 ; Deng *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008], les poumons [Deng *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008] et les os [Wang *et al.*, 2004].

Un résultat contradictoire indiquant que les NTCs ne sont retenus dans aucun organe du système réticulo-endothélial (foie, rate) [Singh *et al.*, 2006] semble souligner la difficulté d'étudier les NTCs en raison de la diversité de leurs caractéristiques et des différents protocoles expérimentaux utilisés.

Le métabolisme

Pas de donnée étudiée.

¹³ La **phagocytose** est une forme d'endocytose caractérisée par l'adhésion, l'ingestion et éventuellement la digestion de particules de diamètre microscopique, puis par le rejet des déchets. Elle concerne en général des éléments solides et ne sert uniquement qu'à des leucocytes et polymorphonucléaires neutrophiles (éléments du système immunitaire).

¹⁴ L'**endocytose** (ou internalisation) a lieu quand une partie de la membrane cellulaire entoure complètement une particule et la fait pénétrer de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

¹⁵ Le passage des particules à travers la membrane plasmique peut se faire par **diffusion simple** ou passive (dans le sens des concentrations fortes vers les concentrations faibles, jusqu'à équilibre des concentrations de part et d'autre de la membrane). Ce type de passage n'est possible que si la molécule est « soluble » dans la membrane phospholipidique, c'est-à-dire qu'elle peut traverser directement la bicouche de phospholipides de la membrane plasmique. La molécule doit donc être hydrophobe (apolaire) ou, si elle est hydrophile (polaire), être suffisamment petite (ex : éthanol).

La biopersistance

Il n'est pas aisé de mesurer la biopersistance des NTCs dans les tissus biologiques, constitués eux-mêmes de carbone en grande majorité. Quelques investigateurs ont utilisé la petite fraction de métaux intimement liée aux NTCs provenant des catalyseurs de synthèse comme traceurs des NTCs dans le poumon ou d'autres organes [Muller *et al.*, 2005 ; Elgrabli *et al.*, 2008a ; Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009].

Sur les 4 études qui ont examiné la biopersistance des MWCNTs par voie respiratoire [Muller *et al.*, 2005 ; Elgrabli *et al.*, 2008a ; Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009 ; Pauluhn 2010a], toutes indiquent que les NTCs sont biopersistants plusieurs mois dans les poumons. De plus, leur demi-vie d'élimination pulmonaire est dose-dépendante [Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009 ; Pauluhn 2010a] et la cinétique de leur clairance¹⁶ semble être influencée par leur longueur [Muller *et al.*, 2005].

Par ailleurs, d'après la seule étude réalisée par voie intraveineuse, les NTCs semblent également persister plusieurs mois dans le foie [Deng *et al.*, 2007].

La biopersistance des NTCs dans l'organisme (essentiellement poumons et foie) constitue une source d'inquiétude quant à la dangerosité à long terme de ces matériaux.

L'excrétion

La voie d'excrétion des NTCs dépend de la voie par laquelle l'organisme a été exposé.

Après exposition par voie respiratoire, les NTCs sont lentement éliminés des poumons [Deng *et al.*, 2007]. Les macrophages alvéolaires semblent jouer un rôle important dans la clairance des NTCs inhalés [Elgrabli *et al.*, 2008a].

Après ingestion, les NTCs semblent être éliminés rapidement via le tube digestif et excrétés dans les fèces [Deng *et al.*, 2007].

Quant aux NTCs injectés (par voie intrapéritonéale ou intraveineuse), ils semblent être excrétés rapidement (de manière exponentielle) et majoritairement par la voie urinaire (excrétion rénale) [Wang *et al.*, 2004 ; Singh *et al.* ; 2006 ; Cherukuri *et al.*, 2006 ; Lacerda *et al.*, 2008 a et b ; Ruggiero *et al.*, 2010]. Cependant, les MWCNTs accumulés dans le foie (principalement) et les poumons sous forme d'agrégats semblent être éliminés lentement de ces organes [Georgin *et al.*, 2009].

¹⁶ Cf. Définition de **clairance** en note de bas-de-page n° 7, p 12.

3.2 Etudes *in vitro*

3.2.1 Cytotoxicité

Les études concernant les NTCs montrent parfois un fort effet cytotoxique¹⁷ dès quelques µg/mL [Cui *et al.*, 2005 ; Jia *et al.*, 2005 ; Magrez *et al.*, 2006 ; Manna *et al.*, 2005 ; Murr and Soto, 2004 ; Sayes *et al.*, 2006b ; Wick *et al.*, 2007] et d'autres fois un effet beaucoup plus faible voire nul [Monteiro-Riviere *et al.*, 2005b ; Pulskamp *et al.*, 2007 ; Davoren *et al.*, 2007 ; Dumortier *et al.*, 2006].

3.2.1.1 Tests réalisés sur des modèles de cellules pulmonaires

Afin d'expliquer les mécanismes impliqués dans la diminution de la viabilité cellulaire, plusieurs auteurs ont étudié l'hypothèse du rôle d'un stress oxydant et d'une réponse inflammatoire.

Shvedova *et al.*, ont exposé des cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) à des SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) (0 ; 0,06 ; 0,12 et 0,24 mg/mL pendant 18 h). Ils ont observé une apoptose¹⁸ des cellules associée à un stress oxydant (formation de radicaux libres¹⁹, accumulation de produits de peroxydation lipidique et diminution des antioxydants dans les cellules) qui peut être à l'origine d'une inflammation et de dommages de l'ADN. Les auteurs concluent que l'exposition à des SWCNTs peut provoquer de la toxicité pulmonaire et que le stress oxydant est un des mécanismes potentiellement impliqués dans les dommages cellulaires induits par les SWCNTs [Shvedova *et al.*, 2004].

Magrez *et al.*, ont exposé trois lignées cellulaires de tumeur du poumon humain : H596 (adénocarcinome épidermoïde), H446 (cancer à petites cellules) et Calu-1 (cellules de cancer pulmonaire ayant métastasé à la plèvre) à des MWCNTs (\emptyset_{moy} : 20 nm ; L_{moy} : non connue) en comparaison avec des nanofibres de carbone et du noir de carbone. Ils ont rapporté une diminution de la viabilité des trois types de cellules exposées (due à une condensation de la chromatine près de la membrane nucléaire ainsi qu'à une rétractation du cytoplasme conduisant à une perte de contact entre les cellules) dépendante de la dose de MWCNTs (0,002 à 0,2 µg/mL pendant 4 jours). À noter que le noir de carbone a entraîné la plus forte toxicité et que la toxicité était dépendante de la taille des particules (noir de carbone > fibre de carbone > MWCNTs). Les auteurs soulignent ainsi que les NTCs ont été moins toxiques que les particules de noir de carbone dans leur étude [Magrez *et al.*, 2006], alors que la situation inverse a été observée dans d'autres études [Muller *et al.*, 2005]. Les auteurs ont également remarqué que la cytotoxicité augmentait quand la surface des particules était fonctionnalisée après un traitement acide [Magrez *et al.*, 2006].

Une perte d'adhérence de cellules du mésothéliome (MSTO-211H) exposées à des SWCNTs (\emptyset_{moy} des agrégats : 20 nm et L_{moy} : non précisés) a également été constatée [Wick *et al.*, 2007].

Au contraire des résultats obtenus dans les autres études traitant du même sujet, Pulskamp *et al.* n'ont pas observé d'effet sur la viabilité cellulaire ni induit la libération de médiateurs inflammatoires (NO, TNF- α , IL-8) en exposant (5, 10, 50 et 100 µg/mL) une lignée cellulaire de macrophages alvéolaires de rats (NR8383) et une lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaine (A549) à des SWCNTs purifiés (\emptyset_{moy} : 1-2 nm ; L_{moy} : non précisé) et deux types de MWCNTs (\emptyset_{moy} : 10-20 nm ; L_{moy} : non précisé ; \emptyset_{moy} : 30-50 nm ; L_{moy} : non précisé), en

¹⁷ Un agent **cytotoxique** est un produit qui a un effet nocif sur les cellules (diminution de la viabilité, inhibition de la prolifération cellulaire, etc.).

¹⁸ On nomme **apoptose** (ou mort cellulaire programmée, ou suicide cellulaire) le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal.

¹⁹ Les **radicaux libres** sont des molécules instables qui, lorsqu'elles ne sont pas neutralisées par des antioxydants (vitamines, enzymes, minéraux), endommagent de manière irréversible les principaux constituants des cellules de l'organisme (membranes lipidiques, protéines et ADN) et sont à l'origine de maladies et cancers. Ils jouent également un rôle clé dans la génotoxicité et l'inflammation.

comparaison avec du noir de carbone et du quartz. Néanmoins, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une diminution du potentiel de membrane mitochondriale toutes deux dose- et temps-dépendantes ont été détectées pour les 2 types cellulaires après exposition aux MWCNTs mais pas pour les SWCNTs purifiés. Ceci a conduit les auteurs à supposer que les catalyseurs métalliques contenus dans les MWCNTs étaient responsables de leur effet biologique [Pulskamp *et al.*, 2007].

Casey *et al.* ont montré que certains effets cytotoxiques des SWCNTs (HiPcCoTM; \varnothing_{moy} et L_{moy} non précisés ; obtenus auprès de Aldrich et contenant jusqu'à 10 % de Fer, 3 % de Nickel, 2 % d'Yttrium et du carbone amorphe) observés *in vitro* sur des lignées pulmonaires épithéliales A549 pouvaient être indirects, résultant notamment de l'adsorption de certains composés du milieu de culture, appauvrissant celui-ci en facteurs trophiques. Dans l'expérience rapportée par ces auteurs, ils montraient que l'incubation de 1,5 à 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SWCNTs pendant 2 heures avec le milieu de culture contenant 5 % de sérum, suivie d'une centrifugation et d'une filtration pour éliminer les SWCNTs (ainsi que les composés adsorbés) appauvrissait suffisamment le milieu de culture pour altérer la réponse de cellules épithéliales A549 dans deux tests de cytotoxicité (Alamar blue et clonogénicité -voir encadrés-). Les auteurs ont écarté la possibilité que la cytotoxicité ainsi observée ne puisse être médiée par du Fe relargué par les SWCNTs, la contribution possible du Ni ou de l'Yt ne semble toutefois pas avoir été examinée [Casey *et al.*, 2008].

Le **test Alamar BlueTM** est conçu pour mesurer quantitativement la prolifération cellulaire et la cytotoxicité de substances sur les cellules.

L'Alamar BlueTM est composé d'un indicateur Rédox qui change de couleur en fonction de la réduction chimique du milieu de culture, c'est un indicateur colorimétrique sensible à l'activité métabolique cellulaire. En fait, ce test n'a pas d'effet toxique cellulaire et n'a pas besoin de la lyse des cellules, ce qui permet de suivre l'évolution du signal de manière cinétique.

Le **test de clonogénicité** permet d'évaluer la capacité de prolifération des cellules après traitement dans des conditions peu favorables en général, en très faible concentration ou sur un support empêchant tout accrochage des cellules.

Rotoli *et al.* ont montré que l'incubation de cellules épithéliales bronchiques (lignée Calu3) avec des SWCNTs (\varnothing_{moy} : 0,7-1,2 nm ; L_{moy} : 2-20 μm) et des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 110-170 nm ; L_{moy} : 5-9 μm) (100 $\mu\text{g}/\text{L}$) induisait une altération des jonctions paracellulaires, mesurée par la méthode TEER et par le transport du mannitol, sans toutefois affecter la viabilité cellulaire. Les SWCNTs ont produit des changements beaucoup plus faibles du TEER que les MWCNTs [Rotoli *et al.*, 2008]. Dans une étude ultérieure, ces mêmes auteurs ont rapporté que seuls les NTCs longs (SWCNT, 0,5-100 μm ou MWCNT, 5-9 μm) mais pas les NTCs courts (SWCNT et MWCNT, 0,5-2 μm) (à 100 $\mu\text{g}/\text{L}$) augmentaient la perméabilité des cellules épithéliales humaines (Calu3) mesurée par la méthode TEER [Rotoli *et al.*, 2009].

Herzog *et al.* ont étudié la réponse de cellules épithéliales pulmonaires (lignée immortalisée A549 et primaires NHBE) exposées à des HiPcoTM SWCNTs (\varnothing_{moy} : 0,8-1,2 nm ; L_{moy} : 800 nm ; surface : 487,15 m^2/g) pendant 6 à 48 h, en présence et en absence de DPPC (constituant majeur du surfactant pulmonaire) et/ou de TNF- α (tumor necrosis factor) sensé mimer l'inflammation provoquée par une infection pulmonaire. Ils ont conclu que les SWCNTs réduisaient la réponse pro-inflammatoire des cellules épithéliales (IL-6, IL-8, TNF- α et MCP-1) et cet effet n'était pas significativement modulé par le DPPC ou le TNF- α [Herzog *et al.*, 2009].

Tabet *et al.* ont étudié la réponse des lignées pulmonaires épithéliales A549 et mésothéliales MeT5A à des MWCNTs (GRAPHISTRENGTH C100) (\varnothing_{moy} : quelques centaines de μm ; L_{moy} : non précisé) dispersés dans du PBS, de l'éthanol ou de la dipalmitoyl lécithine. Ils n'ont pas observé d'internalisation des MWCNTs à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pas d'altération de la perméabilité membranaire (relargage de lactate déshydrogénase LDH) ou d'apoptose, ni d'induction d'un stress oxydant. En

revanche les MWCNTs induisaient une réduction de l'activité métabolique (test MTT) des deux types cellulaires [Tabet *et al.*, 2009].

3.2.1.2 Tests réalisés sur des modèles de cellules de la peau

La plupart des études *in vitro*, qui se sont intéressées à la toxicité cutanée des NTCs ont été réalisées sur deux types cellulaires : les kératinocytes [Shvedova *et al.*, 2003 ; Manna *et al.*, 2005 ; Monteiro-Riviere *et al.*, 2005b] et les fibroblastes [Chlopek *et al.*, 2006], voire parfois sur des modèles de peau artificielle [Murray *et al.*, 2009].

Dans une étude *in vitro* de Shvedova, les SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) ont causé une diminution significative de la viabilité cellulaire et des biomarqueurs du stress oxydant (ex. réserve des antioxydants) avec une relation dose-réponse, ainsi qu'une augmentation significative des peroxydes lipidiques sur les kératinocytes épidermiques humains (0 ; 0,06 ; 0,12 et 0,24 mg/mL de SWCNTs pendant 18 h). Les auteurs mentionnent que leurs résultats indiquent que l'exposition aux SWCNTs non purifiés peut conduire à une augmentation de la toxicité cutanée chez les travailleurs exposés [Shvedova *et al.*, 2003].

Manna *et al.* ont étudié la toxicité de SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) sur des kératinocytes humains. Les résultats montrent une augmentation du stress oxydant et l'inhibition de la prolifération cellulaire suite à des expositions à des concentrations de 0,5 à 10 $\mu\text{g/mL}$ pour des périodes de 12 à 72 heures, de même qu'une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire. Les résultats obtenus suggèrent que les SWCNTs activent le facteur de transcription NF- κB des kératinocytes de façon dose-dépendante et que le mécanisme d'activation serait relié à l'activation de kinases due au stress oxydant. L'expression de protéines actives conduirait à une réponse inflammatoire [Manna *et al.*, 2005].

Monteiro-Riviere et collaborateurs, ont exposé des kératinocytes épidermiques humains à des concentrations de MWCNTs (\emptyset_{moy} : 100 nm ; L_{moy} : 50 μm) allant de 0,1 à 0,4 mg/mL. Ils ont constaté une diminution de la viabilité cellulaire de façon dose-dépendante, ainsi que l'augmentation de la concentration d'un marqueur d'inflammation (l'interleukine-8, ou IL-8) de façon proportionnelle à la durée d'exposition (comprise entre 1 et 48 h). Ces effets sont associés à l'internalisation des MWCNTs dans des vacuoles cytoplasmiques dès 1 heure d'exposition (*voir l'absorption des NTCs au § 3.1.1*). Les auteurs soulignent que le fer n'est pas impliqué dans l'augmentation de l'IL-8 puisque l'analyse des particules a révélé que les MWCNTs n'en contenaient pas [Monteiro-Riviere *et al.*, 2005b].

L'internalisation cellulaire des nanomatériaux pourrait représenter un moyen de passage de la barrière cutanée. Ce phénomène reste à identifier et à approfondir.

A l'inverse de ces diverses expériences réalisées sur des kératinocytes, qui montrent une cytotoxicité des NTCs, Chlopek *et al.* ont rapporté l'excellente biocompatibilité de MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) hautement purifiés sur des fibroblastes [Chlopek *et al.*, 2006]. Selon ces auteurs, une possible action à long terme résulterait davantage de facteurs physiques que d'interactions chimiques.

En revanche, Ding *et al.* ont exposé des fibroblastes humains à des MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} : non précisés) et ont montré que ces derniers interrompaient le cycle cellulaire et provoquaient l'apoptose des cellules [Ding *et al.*, 2005].

Enfin, l'exposition d'un modèle de peau artificielle (EpiDerm FT) à des SWCNTs bruts (\emptyset_{moy} : 1,5 nm ; L_{moy} : 1-100 μm) a montré un épaissement de l'épiderme, une accumulation et une activation des fibroblastes du derme, entraînant une augmentation du collagène et une libération de cytokines pro-inflammatoires. L'exposition de cellules d'épiderme murin (JB6 P+) aux mêmes SWCNTs non purifiés (30 % de fer) a entraîné la production de radicaux hydroxyles²⁰ et causé une activation dose-dépendante de la protéine AP-1. En revanche, aucun changement significatif de

²⁰ Les **radicaux hydroxyles** (OH•) sont une forme toxique de l'oxygène. Ils sont considérés comme espèces réactives de l'oxygène et sont, par définition, des radicaux libres. Ils participent au stress oxydant des cellules.

l'activation d'AP-1 n'a été détecté lors de l'introduction de SWCNTs partiellement purifiés (0,23 % de fer) dans les cellules. Paradoxalement, NF- κ B a été activé de façon dose-dépendante par des SWCNTs bruts et des SWCNTs partiellement purifiés [Murray *et al.*, 2009].

Vankoningslo *et al.* ont étudié les effets de MWCNTs sur des sébocytes²¹ (SZ95), des kératinocytes et de l'épiderme humain reconstruit. Les NTCs ont été soumis à des protocoles de dispersion conduisant à différents états d'agglomération. L'étude a montré (i) que des NTCs mis en suspension dans de l'eau (p. ex. des agglomérats micrométriques) n'étaient pas nocifs pour les cellules de la peau, à l'exception d'effets mineurs pour les kératinocytes, (ii) qu'une sonication douce diminue l'agglomération des NTCs mais augmente leur cytotoxicité sur les kératinocytes, (iii) que l'ajout d'hydroxypropylcellulose ou de Pluronic F108, qui augmentent la dispersion des NTCs, masque les effets nocifs de la sonication. L'ensemble de ces résultats indique que les NTCs induisent des effets cytotoxiques dans les kératinocytes humains après une courte exposition (24-48 h), tout particulièrement lorsqu'ils sont soniqués. Cependant, les effets cytotoxiques des NTCs bruts et soniqués pourraient être évités en présence d'agents dispersants. Aucun effet cytotoxique n'a été observé *in vitro* avec des sébocytes ou de l'épiderme stratifié reconstruit [Vankoningslo *et al.*, 2010].

3.2.1.3 Tests réalisés sur des modèles de cellules du système immunitaire

Jia *et al.* ont exposé des macrophages alvéolaires à des SWCNTs (\varnothing_{moy} : 1,4 nm ; L_{moy} : 1 μm), des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 10-20 nm ; L_{moy} : 0,5-40 μm) et des fullerènes (C_{60}) en comparaison avec du quartz sur les macrophages alvéolaires de cochons d'Inde. Aucune cytotoxicité n'a été observée pour les fullerènes (jusqu'à une dose de 226 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). En revanche, une cytotoxicité importante des SWCNTs a été observée après 6 h d'exposition. La cytotoxicité suit apparemment une séquence en fonction de la masse : SWCNTs > MWCNT10 > quartz > C_{60} . La dose de particules nécessaire pour induire une diminution de la phagocytose des macrophages était inférieure pour les SWCNTs (0,38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) comparativement aux MWCNTs et aux fullerènes (3,06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Une condensation de la chromatine près de la membrane nucléaire, des changements vacuolaires dans le cytoplasme et la formation de protubérances à la surface de la membrane cellulaire ont été observés dans les macrophages alvéolaires traités avec 3,06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de SWCNTs ou de MWCNTs. Ces signes de nécrose et de dégénération des macrophages pourraient être interprétés comme étant la conséquence d'un processus apoptotique [Jia *et al.*, 2005].

Dans une étude similaire, Murr *et al.* ont comparé la toxicité de SWCNTs (\varnothing_{moy} : 2-20 nm ; L_{moy} : 10-50 μm) et de deux types de MWCNTs (\varnothing_{moy} respectifs : 1-3 μm et 0,1-3 μm ; L_{moy} respectives : 3 nm-3 μm et 50 nm-1 μm) sur des macrophages alvéolaires de souris. Le chrysotile²² et le noir de carbone²³ ont été utilisés comme contrôles. Les cellules ont été exposées à des concentrations allant de 0,005 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 48 heures. Toutes les particules ont induit une mort cellulaire et ceci à partir de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La diminution de la viabilité entraînée par les NTCs est dépendante de la dose, et similaire à celle observée avec le chrysotile. Le noir de carbone a été légèrement moins toxique que les NTCs et le chrysotile [Murr *et al.*, 2005].

Soto *et al.*, ont étudié la viabilité de macrophages de poumons de souris exposés à différents nanomatériaux. Le chrysotile a été utilisé comme contrôle positif. Les auteurs soulignent que la réponse des cellules aux agrégats de MWCNTs (\varnothing_{moy} : 9,7 nm ; L_{moy} : 5,9 μm) a été très similaire à la réponse au chrysotile [Soto *et al.*, 2005].

Shvedova *et al.* ont exposé des macrophages de souris (RAW 264.7) à 0,1 mg/mL de SWCNTs (\varnothing_{moy} : 1-4 nm ; L_{moy} : non spécifiée ; Surface : 1 040 m^2/g) pendant 6 h. Ils ont observé une réponse inflammatoire avec la production de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) et de IL-1 β

²¹ Les **sébocytes** sont les cellules des glandes sébacées, responsable de la synthèse du sébum.

²² Le **chrysotile** est un minéral naturel fibreux qui appartient à la famille des serpentines. C'est un silicate de magnésium hydraté. Le chrysotile fait partie du groupe des amiantes utilisées dans l'industrie.

²³ Le **noir de carbone** est constitué de très petites particules de carbone, plus pures que celles trouvées dans la suie. C'est la forme de carbone élémentaire la plus répandue et utilisée.

(*Interleukine-1*), mais pas de réponse oxydative, de production de monoxyde d'azote (NO), ni d'apoptose cellulaire, contrairement à une étude précédente (2004) sur des cellules épithéliales bronchiques [Shvedova *et al.*, 2005].

Dans une étude sur le même type cellulaire, Potapovich *et al.* ont exposé les macrophages à des SWCNTs (Ø_{moy} et L_{moy} non connus) contenant différentes proportions de fer. Les auteurs ont observé une phagocytose des SWCNTs par les macrophages ainsi qu'une diminution du glutathion²⁴ (antioxydant) et une augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Aucune production intracellulaire d'anion superoxyde (O_2^-) ou de NO n'a été observée suite à l'exposition. Les SWCNTs riches en fer ont catalysé la conversion de l' O_2 extracellulaire en radicaux hydroxyles suite à l'activation des macrophages, et ont stimulé la production d'IL-6. Les auteurs soulignent que les dommages aux cellules et aux tissus peuvent être augmentés par une synergie entre la réponse inflammatoire et le potentiel oxydant du fer présent dans les SWCNTs. En effet, l'inflammation causée par les SWCNTs fournit un environnement propice à l'action oxydante du fer [Potapovich *et al.*, 2005].

Bottini *et al.* ont montré que 400 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs (Ø_{moy} : 20-40 nm ; L_{moy} : 1-5 μm) pouvait entraîner une augmentation massive des cellules (lymphocytes T) en apoptose [Bottini *et al.*, 2006].

Dumortier *et al.* ont établi que des nanotubes de carbone fonctionnalisés étaient pris en charge par les lymphocytes B et T et par les macrophages *in vitro* sans affecter la viabilité cellulaire. Les concentrations de SWCNTs (Ø_{moy} et L_{moy} non connus) utilisées se situaient dans une plage de 1 à 10 $\mu\text{g/mL}$ avec des temps d'incubation de 4 à 24 heures. Les SWCNTs ont été fonctionnalisés avec des radicaux contenant des ions ammonium puis rendus fluorescents par addition d'isothiocyanate de fluorescéine sur l'azote. Cette forme hautement soluble dans l'eau n'a pas influencé l'activité fonctionnelle de cellules immunorégulatrices. Ils n'ont pas induit de mort cellulaire ou d'activation de lymphocytes ou de macrophages. Des NTCs contenant des chaînes polyéthylène glycol également fonctionnalisées par la suite avec de l'isothiocyanate de fluorescéine et moins solubles ont formé une suspension stable dans l'eau. Ils préservent la fonctionnalité des lymphocytes mais provoquent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et modifient subséquemment leur capacité à répondre à un stimulus physiologique [Dumortier *et al.*, 2006].

Pulskamp *et al.* ont démontré que les NTCs peuvent pénétrer la membrane cellulaire de macrophages (NR8383) de rats et avoir une influence sur leur physiologie et leur fonction cellulaire (*pour plus de détails, voir la présentation de l'étude au § 3.2.1.1*) [Pulskamp *et al.*, 2007].

Pour documenter le rôle des macrophages dans la formation de granulomes dans le parenchyme pulmonaire de souris exposées à des SWCNTs (*voir aussi § 3.3.1.1.1*), ainsi que le mécanisme d'action, Chou *et al.* ont réalisé une étude *in vitro* d'expression génique sur des macrophages dérivés de cellules THP-1. Ils concluent que l'activation des macrophages par les SWCNTs, en particulier via la voie de signalisation de NF- κ B et de AP-1 sont des éléments essentiels de cette réponse, menant à la stimulation des systèmes immunitaires inné et adaptatif [Chou *et al.*, 2008].

Une étude récente présentée par J. Boczkowski à un congrès début décembre 2010 montre pour la première fois que l'internalisation des MWCNTs et des DWCNTs dans des macrophages s'accompagne d'une réduction du fer initialement sous forme de carbure de fer (Fe_3C) (celui-ci est décarbone par H_2 , conduisant à du Fe^0 et à du méthane (CH_4)) et d'une oxydation partielle en Fe_3O_4 . Il semblerait que le fer initialement présent dans le nanotube soit mobilisé. Des analyses par microimagerie X montrent une répartition du Fer beaucoup plus homogène et quasiment indépendante de la distribution des NTCs. Les mécanismes ne sont pas encore compris mais les

²⁴ Le **glutathion** est un petit peptide composé de trois acides aminés (la cystéine, l'acide glutamique et la glycine). Il est naturellement présent à l'intérieur de pratiquement toutes les cellules de l'organisme humain. C'est l'un des antioxydants les plus importants. C'est aussi le régulateur et le régénérateur des cellules immunitaires et l'agent détoxifiant le plus efficace de l'organisme humain.

techniques utilisées sont robustes (imagerie EXAFS²⁵) [J. Boczkowski *et al.*, communication orale 2010].

3.2.1.4 Tests réalisés sur d'autres modèles cellulaires

Le traitement de cellules embryonnaires de rein humain (HEK293) avec 10 concentrations comprises entre 0,78 et 200 µg/mL de SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} : non précisés ; Carbon Nanotechnologies) a entraîné une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle (sans SWCNTs). Les résultats ont montré que les SWCNTs pouvaient inhiber la prolifération cellulaire des HEK293, entraîner une augmentation des cellules en apoptose, provoquer une perte d'adhérence des cellules et l'apparition de structures nodulaires qui isolent les cellules liées aux SWCNTs des autres [Cui *et al.*, 2005].

Zhu *et al.* ont montré que les MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} : non précisés) pouvaient induire l'apoptose chez des cellules souches embryonnaires de souris et activer l'expression du gène suppresseur de tumeur de la protéine P53 au bout de 2 h d'exposition [Zhu *et al.*, 2007].

Raja *et al.* ont mis en évidence un ralentissement de la prolifération des cellules de muscle lisse de l'aorte de rat exposées à des SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} : non précisés ; HiPcoTM ; 0,0–0,1 mg/mL) pendant 3,5 jours. Une comparaison avec du charbon activé a permis de montrer une relation inversement proportionnelle entre la taille des nanoparticules de carbone et l'inhibition de la croissance cellulaire [Raja *et al.*, 2007].

En revanche, les travaux de Flahaut *et al.* sur des cellules endothéliales humaines issues de veine ombilicale n'ont montré aucune cytotoxicité pour des concentrations maximales de l'ordre du µg/mL (en utilisant deux tests de cytotoxicité standard, le dosage au rouge neutre²⁶ pour la viabilité cellulaire et le test MTT²⁷ pour l'activité métabolique de la cellule) [Flahaut *et al.*, 2006].

3.2.2 Génotoxicité, mutations géniques et chromosomiques

La liste et le résumé des études *in vitro* relatives à la génotoxicité des NTCs figurent dans la première partie du tableau qui se trouve en Annexe 1.

3.2.2.1 Tests réalisés sur des cellules procaryotes

Trois études de génotoxicité sur bactéries ont été répertoriées. L'une a été effectuée avec des SWCNTs [Kisin *et al.*, 2007], les deux autres avec des MWCNTs [Di Sotto *et al.*, 2009 ; Wirnitzer *et al.*, 2009].

Aucun effet mutagène génique²⁸ n'a été mis en évidence (dans toutes les études, des contrôles positifs ont été effectués). Ces conclusions sur le potentiel mutagène de ces particules sont à

²⁵ La spectroscopie **EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure)** est une technique d'analyse de spectrométrie d'absorption des rayons X utilisant essentiellement le rayonnement synchrotron. Elle apporte des informations sur l'environnement atomique d'un élément donné.

²⁶ Le **rouge neutre** est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par diffusion et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes. Le colorant est exclu des cellules mortes. Après le temps de contact avec les xénobiotiques, la quantité de rouge neutre incorporée dans les cellules est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. La cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre après traitement par le produit chimique mis à l'essai.

²⁷ Le **test MTT** permet une quantification rapide et sensible de la prolifération et de la viabilité cellulaires. Ce test est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En présence du substrat MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide), les sels de tétrazolium du substrat sont transformés en cristaux insolubles de formazan grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase. La quantité de sel formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. Le test du MTT est un indicateur de l'intégrité et de l'activité mitochondriales assimilables à une mesure de la vitalité cellulaire.

²⁸ Un effet **mutagène génique** est observé lors d'une modification de la séquence nucléotidique d'un gène. Ces modifications sont liées (i) à la substitution d'une base, (ii) à la délétion ou à l'insertion d'une base (iii) à

considérer avec prudence. En effet, les tests sur bactéries ne sont pas nécessairement informatifs pour des échantillons de particules, car les contacts entre les particules et les bactéries peuvent être limités (diffusion dans l'agar), en particulier dans le cas des NTCs dont l'agrégation est nettement mise en évidence par les auteurs. Par ailleurs, les particules ne semblent pas aptes à pénétrer dans les bactéries et aucune interaction intracellulaire ni membranaire n'a été mise en évidence.

la perte, à l'addition ou à l'inversion de séquences d'ADN. Par ailleurs, il existe aussi des mutations chromosomiques et génomiques

Dans l'hypothèse d'un effet à distance (solubilisation des NTCs ou production de facteurs mutagènes par ces particules), les agents mutagènes doivent être stables, capables de diffuser et de pénétrer dans les bactéries. On a aujourd'hui peu de données sur les mécanismes susceptibles d'expliquer un effet mutagène de particules sur des bactéries. Dans le cas d'autres particules solides, comme l'amiante, plusieurs travaux qui ont porté sur les tests de Ames (*voir encadré*) n'ont pas montré d'effet mutagène. Des modifications de protocole ont été appliquées (préincubation avec les particules par exemple, généralement appliqués dans les études avec les NTCs ; tests sur souches spécifiques).

L'utilisation plus récente de souches de bactéries déficientes en glutathion²⁹, sensibilisées pour détecter une production d'espèces réactives de l'oxygène (TA100/GN-54 et TA100/NG-57, non utilisées dans les trois études citées), a permis de mettre en évidence un faible effet mutagène de l'amiante [Howden et Faux, 1996].

Le principe du **test de Ames** repose sur des souches bactériennes (le plus souvent de *Salmonella typhimurium*) portant des mutations dans les gènes nécessaires à la synthèse de l'histidine. Elles sont donc auxotrophes pour l'histidine (elles requièrent un apport d'histidine pour se développer).

Le test permet d'évaluer la facilité que possède une substance à induire une réversion de la souche auxotrophe.

Dans le cas d'une substance mutagène, on observe ainsi l'apparition de souches prototrophes (ne nécessitant plus d'histidine pour croître).

²⁹ cf. Définition du **glutathion** en note-de-bas de page n°24, p 21.

3.2.2.2 Tests réalisés sur des cellules eucaryotes

Dix-huit publications décrivant des études de mutagénicité sur des cellules eucaryotes ont été répertoriées. Dix études ont été effectuées avec des SWCNTs et 11 avec des MWCNTs (*cf. liste et résumés des études en Annexe 1*).

Divers types cellulaires ont été employés, provenant de différentes espèces (souris, rat, hamster, Homme) et de différentes origines (lymphocytes, cellules épithéliales pulmonaires, fibroblastes, *etc.*).

Avec les SWCNTs, concernant l'étude des lésions génotoxiques, des cassures d'ADN double brins ont été détectées par la méthode recherchant la phosphorylation de γ -H2AX dans des cultures de lymphocytes et de fibroblastes humains exposées à des SWCNTs [Cveticanin *et al.*, 2010]. On peut noter que dans cette étude, dans laquelle une augmentation significative des cassures d'ADN a été observée, du sang total avait été employé, les lymphocytes étaient donc associés aux autres cellules leucocytaires.

Huit études ont exploité le test des comètes (*voir encadré*) pour déterminer si les NTCs provoquaient des cassures d'ADN. Les nanotubes provenaient d'origines diverses. Cinq études se sont révélées positives [Kisin *et al.*, 2007 ; Lindberg *et al.*, 2009 ; Migliore *et al.*, 2010 ; Pacurari *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2009], les trois autres négatives [Jacobsen *et al.*, 2008 ; Yamashita *et al.*, 2010 ; Zeni *et al.*, 2008] (*cf. Annexe 1*). La comparaison de ces deux groupes d'études ne met pas en évidence un effet notoire des dimensions des SWCNTs dont la distribution de taille varie entre 0,5 et 100 μ m pour les études positives. Les différences peuvent être liées aux méthodes utilisées. Une seule concentration en SWCNTs et une durée d'incubation ont été utilisées, dans deux études négatives, plusieurs concentrations et différents temps d'incubation ont été employés dans les études positives, avec la mise en évidence d'une relation dose-effet par Lindberg *et al.* [Lindberg *et al.*, 2009].

Dans le travail de Zeni *et al.* [Zeni *et al.*, 2008] où aucun effet n'a été détecté, les SWCNTs ont été soniqués pendant 3 heures, ce qui a pu avoir un impact sur leurs propriétés (longueur, modifications de surface, *etc.*). Par ailleurs, les cellules étaient des lymphocytes purifiés, cellules peu aptes à internaliser des particules.

Concernant l'étude des mutations, un test de mutagénicité a été effectué sur des cellules épithéliales pulmonaires de souris transgéniques (FE1Muta mouse), sans mettre en évidence de mutation [Jacobsen *et al.*, 2008].

Un second test, utilisé par trois auteurs, a porté sur la mise en évidence de micronoyaux (*voir encadré*).

Le test des comètes permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages et enfin lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose.

Ce test permet d'établir une relation dose-effet. C'est un test d'électrophorèse en gel d'agarose de cellules isolées. Après électrophorèse, les noyaux dont l'ADN a subi des cassures prennent une forme de comète et les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé restent ronds. Rapide, sensible, il nécessite peu de cellules et apporte une réponse en 48 heures.

Le test *in vitro* de numération des micronoyaux est un test court de mutagenèse qui permet d'identifier les agents physiques ou chimiques clastogènes ou aneugènes, c'est-à-dire capables d'induire la formation de micronoyaux (fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose) dans des cellules de mammifères.

Il est maintenant largement validé et fait l'objet d'une recommandation de l'OCDE (N°487).

Kisin *et al.* n'ont pas observé de micronoyaux dans des fibroblastes de hamster exposés à différentes concentrations de SWCNTs pendant 24 heures [Kisin *et al.*, 2007].

En revanche, Lindberg *et al.* ont observé une augmentation significative du pourcentage de cellules humaines BEAS 2B exposées à des SWCNTs présentant des micronoyaux, mais après un délai de 48 heures. Aucun effet n'était observé après 24 heures [Lindberg *et al.*, 2009].

De même, Migliore *et al.*, en employant une lignée de macrophages murins transformés (RAW 264.7), ont observé une augmentation dose-dépendante du pourcentage de cellules avec micronoyaux, à partir d'une concentration de 0,10 µg/mL de SWCNTs [Migliore *et al.*, 2010].

Cveticanin *et al.* ont également observé une augmentation significative de cette anomalie dans des lymphocytes et des fibroblastes humains traités avec des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 20-40 nm ; L_{moy} : 1-5 µm, Sigma Aldrich) ou des SWCNTs fonctionnalisés ou non (\varnothing_{moy} et L_{moy} : non précisés) (0,25 à 150 µL pour 5 mL de culture cellulaire au total) [Cveticanin *et al.*, 2010].

Une seule publication a déterminé le potentiel de SWCNTs à provoquer des altérations chromosomiques (notamment aberrations détectées dans les cellules en métaphase, anomalies multipolaires, anaphases anormales, fragmentation du centrosome) par étude de la mitose sur deux types cellulaires, cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS 2B) et cellules épithéliales pulmonaires humaines normales. Des réponses comparables ont été obtenues avec les deux types cellulaires, à savoir une augmentation significative du pourcentage de cellules montrant des anomalies de la mitose (fuseau mono, tri, multipolaire ; anomalies d'anaphase), une fragmentation du centrosome ou une aneuploidie, dès la plus faible concentration utilisée (24 µg/cm²) [Sargent *et al.*, 2009].

Cveticanin *et al.* ont également mentionné la formation de ponts chromosomiques dans des anaphases de fibroblastes humains exposés à des SWCNTs [Cveticanin *et al.*, 2010].

Avec les MWCNTs, onze publications ont été répertoriées ; elles ont porté sur un total de 14 échantillons de MWCNTs (*cf.* liste et résumé des études en Annexe 1). Le test des comètes a été employé dans 6 études et celui des micronoyaux dans 6 études. Trois autres travaux ont porté sur l'analyse des effets sur les chromosomes : aneuploidie (2 études), aberrations chromosomiques structurales (1 étude) et échanges entre chromatides sœurs (1 étude). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont déterminé le potentiel des MWCNTs à provoquer un endommagement de l'ADN, l'induction d'enzymes de réparation et l'oxydation de bases (2 études), la formation de foyers de γ -H2AX³⁰ (1 étude) ou des mutations géniques (2 études).

Une majorité d'études a montré un effet positif pour ce qui concerne les deux premiers tests (formation de comètes et de micronoyaux). Une augmentation significative de la formation de comètes a été observée dans 4 études, de manière dose-dépendante dans 3 d'entre elles [Karlsson *et al.*, 2008 ; Migliore *et al.*, 2010 ; Patlolla *et al.*, 2010 ; Yamashita *et al.*, 2010].

La comparaison avec les études négatives rapportées par Yashimata *et al.* ne permet pas de déterminer l'origine des différences. Ces derniers auteurs ont testé 3 échantillons différant par leurs dimensions, dont un seul a provoqué la formation de comètes ; ils suggèrent que l'effet est associé à la plus grande longueur. En effet, l'échantillon actif (M1) est le plus long (5 -15 µm), mais il provient également d'une autre source, et son diamètre est intermédiaire entre celui des 2 autres. Par ailleurs, une seule concentration a été testée. Les différences pourraient être également liées à l'état de surface des différents types de MWCNTs et / ou aux conséquences de la méthode de dispersion. Il est à noter que l'état de surface des MWCNTs joue un rôle dans le mécanisme d'action, comme cela est suggéré par les travaux de Muller *et al.* qui ont montré qu'un même échantillon voyait son activité génotoxique modifiée, voire abolie, après avoir été chauffé à 2 400°C en absence d'oxygène (test des micronoyaux) [Muller *et al.*, 2008].

Pour ce qui concerne le test des micronoyaux, 4 études ont révélé des effets positifs dont l'étude de Muller (2005) (*mentionnée précédemment au § 3.1.4.1*). Deux autres études ont rapporté une

³⁰ Le marquage des **histones** (protéines basiques en contact étroit avec l'ADN) γ H2AX, permet la mise en évidence des cassures double-brins de l'ADN par microscopie à fluorescence.

augmentation dose-dépendante du pourcentage de cellules présentant des micronoyaux [Migliore *et al.*, 2010 ; Muller, Decordier *et al.*, 2008].

Cveticanin *et al.* ont mentionné la formation de ponts chromosomiques dans des anaphases de fibroblastes humains exposés à des MWCNTs [Cveticanin *et al.*, 2010].

Dans ces études, il n'est pas mentionné si les micronoyaux contiennent des chromosomes entiers ou des fragments. Deux résultats négatifs ont été obtenus : l'un concernait un test sur des lymphocytes purifiés exposés à une concentration de 1 mg/mL de MWCNTs (\varnothing_{moy} : 10-30 nm ; L_{moy} : 1-2 μm ; Shenzhen Nanotech.) [Szendi et Varga, 2008] ; l'autre portait sur des cellules pulmonaires de hamster, les MWCNTs (\varnothing_{moy} : 88 ± 5 nm, L_{moy} : $5,0 \pm 4,5$ μm ; 1 mg/mL) ont eu un effet sur la ségrégation des chromosomes caractérisée par l'augmentation du pourcentage de cellules aneuploïdes [Asakura *et al.*, 2010]. Un effet semblable, avec augmentation dose-dépendante du pourcentage de cellules avec micronoyaux, a été observé sur des cellules pulmonaires humaines et de rats exposés à 10, 20 ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs (\varnothing_{moy} : 11,3 nm, L_{moy} : 700 nm) [Muller, Decordier *et al.*, 2008].

Deux études ont abordé les effets au niveau des chromosomes, qui n'ont pas permis de mettre en évidence d'anomalies structurales ou d'échanges entre chromatides sœurs [Szendi et Varga, 2008 ; Wirnitzer *et al.*, 2009]. Des altérations de l'ADN ont été montrées dans deux autres études, par la mise en évidence de l'oxydation de bases puriques et pyrimidiques et, de manière indirecte, par l'induction d'enzymes de réparation de l'ADN [Migliore *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2007].

Deux études de mutagenèse ont été pratiquées. L'une n'a pas montré de mutation au locus *hgprt* dans une lignée dérivée de poumon de hamster chinois nouveau né [Asakura *et al.*, 2010] ; l'autre a mis en évidence une mutation du gène *Aprt* dans des cellules souches embryonnaires hétérozygotes (*Aprt*^{+/−}) de souris [Zhu X. *et al.*, 2007]. Il est à noter qu'avec l'amiante, des mutations au locus *hgprt* ne sont généralement pas détectées.

3.2.3 Cancérogénicité : mécanismes *in vitro*

Pacurari *et al.* ont exposé des cellules mésothéliales humaines à des SWCNTs (\varnothing_{moy} : 0,8-2 nm ; L_{moy} : non précisée). Ils ont montré que les SWCNTs généraient des espèces réactives de l'oxygène (ROS), augmentaient la mort cellulaire, les dommages à l'ADN, l'activation de la phosphorylation de la protéine kinase MAPK³¹ et l'expression des gènes PARP-1³², de deux facteurs de transcription importants (AP-1³³ et NF- κ B³⁴), de la protéine p38, et d'une protéine connue pour jouer un rôle majeur dans la genèse du cancer du poumon et du mésothéliome (Akt³⁵) d'une manière dose-dépendante. Ces événements récapitulent quelques événements moléculaires possiblement impliqués dans le développement du mésothéliome associé à une exposition à l'amiante. Ces travaux suggèrent que les SWCNTs peuvent causer une réponse cellulaire adverse dans les cellules mésothéliales par l'activation de signaux moléculaires associés à un stress oxydant qui, d'après les auteurs, est suffisante pour justifier l'étude *in vivo* d'animaux exposés à des NTCs [Pacurari *et al.*, 2008].

³¹ **MAPK** : protéine kinase activée par les mitogènes.

³² **PARP** : poly(ADP-ribose) polymérase-1.

³³ **AP-1** : activator protein-1.

³⁴ **NF- κ B** : nuclear factor κ B.

³⁵ **Akt** : protein serine-threonine kinase.

3.2.4 Immunotoxicité³⁶

Ding *et al.* ont rapporté que l'exposition de fibroblastes humains de peau à des doses élevées (0,6 µg/mL) de MWCNTs (\varnothing_{moy} : 30 nm ; L_{moy} : non spécifié) stimulait l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire [Ding *et al.*, 2005].

Salvador-Morales *et al.* ont étudié l'activation du complément³⁷ par des SWCNTs (dimensions non connues) et des DWCNTs (1-3,5 nm de diamètre et quelques microns à quelques dizaines de microns de longueur, les faisceaux pouvant atteindre 100 µm) dans du sérum humain (0,62-2,5 mg de nanotubes dans 500 µL de sérum). Les deux types de nanotubes de carbone ont activé le complément de façon similaire au zymosan utilisé comme contrôle positif (relation dose-dépendante). Les auteurs concluent que l'activation du complément par les NTCs via les voies classique et alternative pourrait promouvoir l'inflammation et la formation de granulomes. La protéine C1q se lie directement aux NTCs et les protéines se liant en plus grande quantité aux nanotubes sont le fibrinogène et les apolipoprotéines (AI, AIV et CIII) [Salvador-Morales *et al.*, 2006].

Les mêmes auteurs ont aussi étudié l'interaction de DWCNTs (mêmes caractéristiques que précédemment) avec des surfactants pulmonaires faisant également partie du système immunitaire inné (SP-A, SP-D) et ont montré une très forte affinité de ces derniers pour les NTCs, ce qui peut potentiellement amoindrir le système de défense immunitaire du poumon [Salvador-Morales *et al.*, 2007].

3.2.5 Autres effets observés *in vitro*

Narita *et al.* ont rapporté que des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 80 ou 150 nm ; L_{moy} : 8-10 µm) inhibaient la résorption osseuse³⁸ *in vivo* chez la souris et qu'*in vitro*, ces mêmes MWCNTs inhibaient spécifiquement la différenciation des ostéoclastes en réduisant la translocation nucléaire du facteur NFATC1. Ces auteurs ont proposé l'utilisation potentielle des MWCNTs dans certains biomatériaux fonctionnels en contact avec le tissu osseux [Usui *et al.*, 2008 ; Narita *et al.*, 2009].

Fenoglio *et al.*, ont voulu savoir si les NTCs sont capables de produire des radicaux libres. Les auteurs ont étudié la production de radicaux libres par des MWCNTs purifiés (\varnothing_{moy} et L_{moy} non connus) dans une suspension aqueuse. Les résultats suggèrent que les MWCNTs ne génèrent pas de radicaux libres en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les MWCNTs ont démontré une capacité à neutraliser les radicaux libres en présence d'une source externe (le système xanthine/xanthine oxydase) de radicaux hydroxyles (HO) ou d'anions superoxydes. Les auteurs concluent qu'il est possible que la réaction inflammatoire causée par l'exposition aux MWCNTs soit attribuable à des propriétés autres que la formation directe de radicaux libres [Fenoglio *et al.*, 2006].

Plus récemment, Crouzier *et al.* ont confirmé l'absence de production de radical hydroxyle dans un système *in vitro* où 1,5 mg/kg de DWCNTs ($\varnothing_{\text{moy int}}$: 0,5 à 2,5 nm et $\varnothing_{\text{moy ext}}$: 1,2 à 3,2 nm ; L_{moy} : 1 à 10 µm, voire jusqu'à 100 µm au moins pour des faisceaux de NTCs) étaient incubés (après sonication pendant 30 mn) en présence d'eau oxygénée. Ces travaux semblent indiquer que les NTCs pourraient être d'efficaces pièges à radicaux libres [Crouzier *et al.*, 2010]. L'article va même encore plus loin en suggérant qu'il en va de même *in vivo* (voir au § 3.3.1.1.1).

Néanmoins, le comportement en situation « réelle » des NTCs, à l'origine de la formation ou de la capture de radicaux libres, en fonction des conditions expérimentales reste à approfondir. Il se

³⁶ Les **effets immunotoxiques** sont des atteintes au fonctionnement normal du système immunitaire (immunité humorale, cellulaire et réponse non spécifique). Les conséquences classiques de ces effets peuvent prendre des formes variées (telles que l'immunodépression, l'immunostimulation, l'hypersensibilité et l'auto-immunité).

³⁷ Le **complément** est formé d'un groupe de protéines présentes dans le sang et qui interagissent pour défendre l'organisme contre les cellules reconnues comme étrangères [Salvador-Morales *et al.*, 2006].

³⁸ **Résorption osseuse** = destruction du tissu osseux.

pourrait que les divergences soient dues aux impuretés issues des techniques de synthèse employées (catalyseurs métalliques, carbone amorphe, *etc.*), et / ou des impuretés lors de leurs manipulations (endotoxines bactériennes) [Donaldson *et al.*, 2006].

Synthèse relative à la toxicité des NTCs *in vitro*

Cytotoxicité

Une trentaine d'études environ portant sur la cytotoxicité *in vitro* des NTCs ont été étudiées.

L'ensemble de ces études montre un effet cytotoxique³⁹ des NTCs, parfois fort, dès quelques µg/mL, et d'autres fois beaucoup plus faible, voire nul. En réalité, la perte de viabilité cellulaire apparaît le plus souvent pour des concentrations supérieures à 100 µg/mL et pour des temps d'exposition de un voire plusieurs jours.

L'effet cytotoxique des NTCs semble dépendre du temps et de la concentration d'exposition, ainsi que du type cellulaire. Cet effet cytotoxique semble plus important avec les SWCNTs qu'avec les MWCNTs [Jia *et al.*, 2005], mais pas toujours [Rotoli *et al.*, 2008 ; Pulskamp *et al.*, 2007].

La perte de viabilité cellulaire pourrait être en partie due à de l'apoptose⁴⁰. En effet une augmentation des cellules (lymphocytes T, cellules embryonnaires de rein humain, fibroblastes) en apoptose a déjà été constatée en présence de NTCs [Bottini *et al.*, 2006 ; Cui *et al.*, 2005 ; Ding *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2007 ; Pacurari *et al.*, 2008 ; Simon-Deckers *et al.*, 2008] mais pas toujours (macrophages) [Shvedova *et al.*, 2005].

De plus, un ralentissement de la prolifération cellulaire a aussi été démontré (lymphocytes T, cellules de muscle lisse, kératinocytes) [Cui *et al.*, 2005 ; Raja *et al.*, 2007 ; Vankoningsloo *et al.*, 2010].

Les mécanismes impliqués dans ces effets semblent être principalement le stress oxydant, des altérations structurales liées aux processus d'apoptose et de nécrose et la réponse inflammatoire.

Ces résultats semblent indiquer qu'une exposition (par inhalation, ingestion ou par voie cutanée) à des NTCs pourrait s'avérer toxique pour les personnes exposées (notamment les travailleurs).

Cependant, le nombre d'études reste limité et les résultats sont parfois contradictoires, montrant la complexité de l'étude de la toxicité des NTCs et la nécessité de prendre en compte de multiples paramètres. En effet, la très grande diversité des NTCs qui ont ainsi été examinés, leur taille, leur pureté variable (présence des impuretés métalliques des catalyseurs), leur état d'agglomération, leur degré variable d'oxydation de surface, voire de fonctionnalisation ou encore la présence d'un agent dispersant ne permettent pas de dégager une conclusion claire et univoque de l'ensemble de ces études. Enfin, les types cellulaires étudiés sont variables et pas toujours très bien justifiés, ce qui ajoute encore à la variabilité des réponses enregistrées.

Enfin, les tests de cytotoxicité utilisés dans certaines études se sont parfois révélés faussés par les NTCs [Wörle-Knirsch *et al.*, 2006 ; Casey *et al.*, 2007a] et cet aspect doit systématiquement être vérifié. Une bonne pratique consiste à confirmer la réponse cytotoxique à l'aide de différents tests reposant sur des méthodes différentes afin d'exclure la possibilité d'un artefact.

³⁹ Voir la définition de **cytotoxique** en note de bas-de-page n°17, p 17.

⁴⁰ Voir la définition d'**apoptose** en note de bas-de-page n°18, p 17.

Génotoxicité

Un potentiel mutagène⁴¹ des SWCNTs ou des MWCNTs, tel que détectable par les tests de mutagenèse mis en œuvre n'a pas été observé dans les trois études répertoriées réalisées sur les cellules procaryotes [Kisin *et al.*, 2007 ; Di Sotto *et al.*, 2009 ; Wirnitzer *et al.*, 2009]. En raison des limitations de ces tests, on ne peut toutefois pas conclure à une absence de potentiel mutagène des nanotubes de carbone.

Sur les cellules eucaryotes, l'ensemble des travaux (18 études) montre un potentiel mutagène des NTCs. En effet, les travaux effectués avec des SWCNTs ont permis de mettre en évidence un potentiel clastogène⁴² au moyen du test des comètes [Kisin *et al.*, 2007 ; Lindberg *et al.*, 2009 ; Migliore *et al.*, 2010 ; Pacurari *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2009]. L'induction de micronoyaux démontrée dans deux études suggère un potentiel clastogène et / ou aneugène⁴³ [Lindberg *et al.*, 2009 ; Migliore *et al.*, 2010], conforté par une étude démontrant des altérations du processus mitotique et la formation de cellules aneuploïdes [Sargent *et al.*, 2009].

De plus, les travaux effectués avec des MWCNTs permettent également de considérer que ces nanotubes ont un effet génotoxique (mutagène, clastogène et aneugène) potentiel sur les cellules eucaryotes [Karlsson *et al.*, 2008 ; Migliore *et al.*, 2010 ; Patlolla *et al.*, 2010 ; Yamashita *et al.*, 2010 ; Muller, 2008 ; Migliore *et al.*, 2010 ; Muller, Decordier *et al.*, 2008]. Cela résulte de leur capacité à provoquer des cassures d'ADN, des micronoyaux, des aberrations chromosomiques et / ou une ségrégation anormale des chromosomes sur différents types cellulaires. Des altérations de l'ADN ont également été montrées dans deux études [Migliore *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2007].

De l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN qui peuvent soit générer des erreurs, soit restaurer l'intégrité de l'ADN, dépendront les conséquences délétères ou non des effets génotoxiques des MWCNTs.

Les données obtenues *in vitro* sur cultures cellulaires sont confortées par les résultats obtenus *in vivo* (après exposition par voie respiratoire § 3.3.1.5, orale § 3.3.2.1 ou autre § 3.3.4.2).

L'ensemble de ces études montre un effet génotoxique des SWCNTs et des MWCNTs dépendant notamment de la concentration d'exposition, du type cellulaire, ainsi que du type de test et du traitement des NTCs.

Si la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote est un mécanisme reconnu pour rendre compte d'un effet génotoxique, l'origine de ces molécules reste à préciser (réactivité de surface et/ou fonction cellulaire ?).

En outre, il est vraisemblable que les effets génotoxiques dépendent des caractéristiques des fibres ; il serait également intéressant de savoir s'il existe une relation avec le mécanisme d'internalisation (*cf.* § 3.1.1).

Outre les propriétés spécifiques intrinsèques des NTCs, les interactions avec le milieu biologique, en particulier l'adsorption de biomolécules, seraient susceptibles de moduler leur potentiel génotoxique.

Ainsi, le mécanisme d'action génotoxique des NTCs mérite d'être approfondi et des études fondamentales sont nécessaires pour comprendre ce mécanisme.

Cancérogénicité

L'étude concernant les mécanismes mis en jeu dans les effets cancérogènes des NTCs semble indiquer que ceux-ci sont susceptibles de provoquer les mêmes effets pathogènes (impliqués dans le mésothéliome) qu'une exposition à l'amiante. Ces effets sont dose-dépendants [Pacurari *et al.*, 2008].

⁴¹ Voir la définition de **mutagène** en note de bas-de-page n°28, p 23.

⁴² Un **clastogène** est une substance susceptible de provoquer des ruptures dans une molécule d'ADN.

⁴³ Une substance **aneugène** est une substance susceptible de provoquer des anomalies du nombre de chromosomes.

Immunotoxicité

Les trois études présentées dans ce rapport ont montré que les NTCs pouvaient avoir un effet immunotoxique⁴⁴. Dans la première étude, des MWCNTs ont stimulé des gènes impliqués dans la réponse immunitaire [Ding *et al.*, 2005]. Dans les deux autres, des SWCNTs et des DWCNTs ont activé le complément dans du sérum humain, ce qui pourrait promouvoir l'inflammation [Salvador-Morales *et al.*, 2006] et des protéines surfactantes du poumon (SP-A, SP-D) ont montré une très forte affinité pour des DWCNTs, ce qui pourrait potentiellement réduire l'efficacité du système de défense immunitaire du poumon [Salvador-Morales *et al.*, 2006].

Toutefois, le très petit nombre d'études réalisées dans ce domaine limite la portée de ces conclusions.

⁴⁴ Voir la définition d'**effet immunotoxique** en note de bas-de-page n°36, p28.

3.3 Etudes *in vivo*

3.3.1 Etude de la toxicité par voie respiratoire

L'étude de la toxicité respiratoire des NTCs est très importante, car l'exposition par inhalation représente la voie de contact avec ces nanomatériaux qui engendre le plus de préoccupations.

Pour étudier les effets potentiels des NTCs (c'est-à-dire, définir le *danger*), ceux-ci peuvent être administrés par instillation directe dans la trachée (cf. § 3.3.1.1.1, 3.3.1.2.1, 3.3.1.3.2) ou par aspiration pharyngée (cf. § 3.3.1.1.2, 3.3.1.3.1, 3.3.1.5.1). Ces dernières années, quelques équipes ont réussi à produire un aérosol de NTCs, rendant l'étude de la voie d'exposition par inhalation possible (cf. § 3.3.1.1.3, 3.3.1.2.2, 3.3.1.3.3, 3.3.1.5.1). Ce dernier mode d'exposition est plus pertinent au regard de l'exposition humaine potentielle. Le recours à des administrations intratrachéale ou transorale est cependant utile pour mener les premières études, notamment lorsque la quantité de matériau disponible est limitée et que des installations de génération d'aérosols ne sont pas accessibles ou fiables, comme c'était le cas au début des années 2000 pour les NTCs. Il est en effet admis que les modèles expérimentaux ayant recours à l'injection d'une dose unique, malgré le fait qu'ils injectent souvent une dose massive de matériau dans les poumons, offrent une bonne appréhension, au moins qualitative, des effets observés dans les études par inhalation [Henderson *et al.*, 1995 ; Driscoll *et al.*, 2000], en particulier pour comparer la réponse avec des toxiques pulmonaires de référence comme le quartz ou l'amiante, ou pour apprécier la toxicité relative de différents matériaux. Les études menées avec les NTCs ont, en grande partie, confirmé la similitude des réponses observées par instillation/injection et par inhalation (voir *ci-après*).

3.3.1.1 Inflammation et lésions pulmonaires

3.3.1.1.1 Exposition par instillation

Une étude exploratoire de la fonction pulmonaire a été faite chez le cochon d'Inde (2 groupes de 5 mâles) par Huczko *et al.*. Une seule dose de 25 mg de suie contenant des MWCNTs (\varnothing_{moy} et L_{moy} non connus) a été administrée par instillation intratrachéale. Aucun effet sur la fonction pulmonaire (volume courant, fréquence respiratoire et résistance pulmonaire) et l'analyse du liquide provenant du lavage broncho-alvéolaire n'a été observé (après 4 semaines) [Huczko *et al.*, 2001b]. Toutefois, Lam *et al.* mentionnent que l'étude histologique des poumons n'a pas été faite et que ce critère d'évaluation est crucial dans toute étude sur la toxicité pulmonaire impliquant des poussières [Lam *et al.*, 2006].

Lam *et al.* ont étudié la toxicité pulmonaire 7 et 90 jours après l'administration de trois préparations de SWCNTs chez la souris mâle (instillation intratrachéale unique ; 0 ; 0,1 et 0,5 mg/souris). Aucun signe clinique (température corporelle, piloérection, et autres) n'a été observé à 0,1 mg mais il y a eu de l'inflammation et des granulomes pulmonaires (*voir encadré*) pour les nanotubes bruts (Ø_{moy} et L_{moy} non précisés) et les nanotubes purifiés (HiPco™ et CarboLex). Les granulomes étaient composés de macrophages et des SWCNTs administrés (à 0,1 et 0,5 mg). Il y a eu une augmentation de la mortalité pour les NTCs de Carbolex, mais aucune mortalité pour les autres SWCNTs bruts et purifiés. Des signes cliniques ont été observés à 0,5 mg pour les SWCNTs bruts (hypothermie, inactivité et autres), mais aucun pour les SWCNTs purifiés. Les auteurs ont rapporté une augmentation des granulomes pulmonaires pour les trois préparations de SWCNTs. Le noir de carbone et le quartz ont été utilisés comme contrôles ; il n'y a eu aucune inflammation et aucun granulome pour le noir de carbone, mais de l'inflammation et aucun granulome pour le quartz [Lam *et al.*, 2004].

Les **granulomes pulmonaires** sont des structures anatomo-pathologiques 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 corps étranger. Ils sont généralement accompagnés de la sécrétion par les cellules immunitaires de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires.

Warheit *et al.* ont étudié la toxicité pulmonaire jusque 3 mois après l'administration d'une préparation contenant moins de 50 % de SWCNTs (Ø_{moy} : 1,4 nm ; L_{moy} >1 μm , 5 % de Co et 5 % de Ni) chez le rat mâle (instillation intratrachéale unique ; 1 ou 5 mg/kg). Il n'y a pas eu d'effet à 1 mg/kg. À 5 mg/kg, ils ont rapporté un taux élevé de mortalité (~15 %) dans les 24 h post-exposition, causé par un encombrement des voies respiratoires supérieures. Dans le mois suivant l'exposition, une augmentation non statistiquement significative de la prolifération cellulaire pulmonaire et une augmentation des granulomes pulmonaires à caractère multifocal ont également été observés, ainsi qu'une augmentation significative du poids des poumons et une augmentation significative passagère des anomalies du lavage broncho-alvéolaire (cellules neutrophiles, protéines, lactate déshydrogénase (LDH)). Il n'y a eu aucun effet sur le nombre de macrophages pulmonaires. La durée d'observation post-instillation était trop courte pour évaluer l'évolution des lésions pulmonaires et leur éventuelle régression. De plus, les SWCNTs avaient tendance à s'agglomérer formant ainsi des particules plus grosses dont la toxicité pulmonaire pourrait être différente des SWCNTs non agglomérés. Les auteurs ne pouvaient conclure quant à la toxicité inhérente aux SWCNTs (absence de relation dose-réponse, distribution non uniforme et régression possible des granulomes) [Warheit *et al.*, 2004 et 2005].

Muller *et al.* ont étudié l'inflammation et la fibrose dans les poumons de rats traités avec des MWCNTs (98,5 % de carbone, 1 % de Co) non broyés (Ø_{moy} : 9,7 nm ; L_{moy} : 5,9 μm) et broyés (Ø_{moy} : 11,3 nm ; L_{moy} : 0,7 μm) (instillation intratrachéale unique ; 0,5 ; 2 ou 5 mg). Les deux types de MWCNTs ont provoqué une réaction inflammatoire (augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), des protéines, des neutrophiles et des éosinophiles dans le lavage broncho-alvéolaire) et fibrotique (augmentation du dépôt de collagène) ainsi que la production d'une cytokine pro-inflammatoire (TNF- α) dans les poumons. La réponse inflammatoire a été plus prononcée avec les MWCNTs broyés, mais une dose de 5 mg de MWCNTs broyés a induit la même réponse fibrotique que 2 mg de MWCNTs non broyés. Par ailleurs, les auteurs ont observé une plus grande dispersion des MWCNTs broyés à travers le parenchyme pulmonaire où ils ont causé des granulomes dans le tissu interstitiel. L'accumulation d'agglomérats de MWCNTs non broyés dans les voies respiratoires a provoqué l'obstruction partielle ou complète des bronches, la formation de granulomes riches en collagène ainsi qu'une inflammation dans les alvéoles (2 mois après l'instillation). L'administration de noir de carbone utilisé comme contrôle n'a induit que peu d'inflammation et pas de fibrose significative. En revanche, l'amiante (Ø_{moy} : 0,17 μm ; L_{moy} : 2,4 μm) utilisée comme contrôle positif a provoqué les mêmes effets que les MWCNTs [Muller *et al.*, 2005]. Par ailleurs, Donaldson *et al.* ont souligné que la plus grande toxicité des MWCNTs broyés pourrait être attribuable à leur plus grande dispersion dans les poumons ou à l'activité de métaux présents dans les MWCNTs et libérés par le broyage [Donaldson *et al.*, 2006].

Elgabri *et al.* ont administré des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 20-50 nm ; L_{moy} : 0,5-2 μm) (0,1 ; 10 ou 100 μg) dispersés dans une solution de NaCl contenant une concentration identique d'albumine, chez le rat par instillation intratrachéale et ont observé une inflammation pulmonaire et de l'apoptose des macrophages alvéolaires (dès 10 μg) mais pas de formation de granulome, ni de lésion histopathologique ou de fibrose. Ils attribuent l'absence de granulome à la meilleure dispersion des NTCs en présence d'albumine, mais il n'est pas exclu que celle-ci ait modifié la réactivité des MWCNTs [Elgrabli *et al.*, 2008b].

Chou *et al.* ont également observé la formation de granulomes dans le parenchyme pulmonaire de souris, 2 semaines après l'administration (par instillation intratrachéale unique) de 500 μg /souris de SWCNTs (\varnothing_{moy} et L_{moy} non précisés) [Chou *et al.*, 2008] (voir aussi § 3.2.1.3).

Associée aux granulomes, une réaction fibrosante peut se développer, dont les origines sont encore mal connues [Mangum *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2005 ; Carrero-Sanchez *et al.*, 2006]. Cette fibrose se caractérise par un épaissement du tissu alvéolaire, composé de collagène et d'élastine, en présence de NTCs.

Al Faraj *et al.* ont montré que des SWCNTs bruts pouvaient être détectés dans les poumons par la technique non invasive de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) utilisant de l'hélium-3 hyperpolarisé (HP-(3)He). La détection *in vivo* des NTCs repose sur la présence des impuretés métalliques qu'ils contiennent [Al Faraj *et al.*, 2009]. Les mêmes auteurs ont ensuite réalisé une étude longitudinale afin de suivre, à l'aide de cette technique, les effets chroniques et à long-terme des SWCNTs dans les poumons pendant 3 mois. Des IRM utilisant de l'HP-(3)He ou des protons (H), des analyses histopathologiques *ex vivo* et de la microscopie électronique en transmission (MET) ont été mis en œuvre afin d'évaluer la biodistribution et les effets biologiques de SWCNTs bruts administrés par instillation intratrachéale. La combinaison de ces techniques a permis de montrer que les granulomes et l'inflammation dus à l'instillation de SWCNTs bruts apparaissaient de manière temps- et dose-dépendante [Al Faraj *et al.*, 2010].

Crouzier *et al.* ont exposé des souris par instillation intranasale à 1,5 mg/kg de DWCNTs (\varnothing_{moy} : 0,5-2,5 nm à l'intérieur et 1,2-3,2 nm à l'extérieur des tubes ; L_{moy} : 1-10 μm voire 100 μm pour les faisceaux). Six, 24 ou 48 h après l'administration du produit, l'inflammation et la localisation des DWCNTs ont été observées au microscope. L'examen des poumons et l'élévation des cytokines pro-inflammatoires dans le plasma (présence de leptine et d'IL-6 au bout de 6 h) ont confirmé l'induction d'une réaction inflammatoire. Paradoxalement à ce qui a été observé dans d'autres études, celle-ci était accompagnée localement d'une réduction du stress oxydatif. En effet, les auteurs ont observé une diminution des ROS⁴⁵ non seulement *in vitro* (voir au § 3.2.5), mais aussi *in vivo* dans les poumons. Cet effet pourrait être attribué à la pureté (c'est-à-dire à l'absence de contamination métallique biodisponible) des NTCs utilisés, qui auraient la capacité de piéger les ROS libérés par les macrophages au moment de l'inflammation [Crouzier *et al.*, 2010].

3.3.1.1.2 Exposition par aspiration pharyngée

Shvedova *et al.* ont exposé des souris (C57BL/6) à des SWCNTs purifiés (99,7 % carbone et 0,23 % fer en poids) (\varnothing_{moy} : 1-4 nm ; L_{moy} : non spécifié ; surface : 1,040 m²/g) par aspiration pharyngée (dose unique ; 0, 10, 20 et 40 μg /souris). Les auteurs ont observé des effets pulmonaires inhabituels incluant une inflammation aiguë suivie de la formation rapide et progressive de granulomes et de fibrose (relation dose-dépendante). Ils ont associé la fibrose du tissu interstitiel et l'épaississement des parois des alvéoles aux SWCNTs non agglomérés alors que la formation des granulomes a été associée à des cellules épithéliales hypertrophiées entourant des agglomérats de SWCNTs. L'analyse du liquide provenant du lavage broncho-alvéolaire a montré une augmentation des protéines, de la LDH et de l'activité de la γ -glutamyl transférase (indicateurs de dommages cellulaires ; relation dose-dépendante). L'accumulation d'un marqueur de stress oxydant (4-hydroxynonanal) et une diminution du glutathion (antioxydant) dans les poumons ont également été notées. Une accumulation de neutrophiles et une

⁴⁵ ROS: Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène).

augmentation des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) ont été observées au jour 1, mais les niveaux de TNF- α et d'IL-1 β sont retournés au niveau des contrôles 3 jours après l'exposition. L'accumulation de lymphocytes (jour 3) a été suivie par une accumulation de macrophages et de TGF- β 1 (facteur de croissance impliqué dans la fibrogenèse) (jour 7). Des troubles de la fonction respiratoire, une diminution de l'élimination des bactéries (*Listeria monocytogenes*) et une augmentation des cellules alvéolaires de type II (AT-II) ont aussi été observées. Des particules de noir de carbone ultrafines et de SiO₂ n'ont pas provoqué la formation de granulomes ou l'épaississement des parois des alvéoles à la même dose (40 μ g/souris) et la réponse inflammatoire a été moins marquée qu'avec les SWCNTs. La dose de 20 μ g de SWCNTs équivaut au dépôt pulmonaire résultant de l'exposition d'un travailleur à la limite d'exposition permise (PEL) de l'OSHA pour le graphite (5 mg/m³) pendant 20 jours (8 h par jour). Les auteurs concluent que des travailleurs exposés à une telle concentration de SWCNTs peuvent être à risque de développer des lésions pulmonaires [Shvedova *et al.*, 2005].

Mangum *et al.* ont exposé des rats à une aspiration oropharyngée unique de SWCNTs (SWCNT individuel : \varnothing_{moy} : 2 nm ; L_{moy} : quelques μ m ; 2 mg/kg de poumon). Ils n'ont pas observé une inflammation des poumons (1 jour et 21 jours après l'exposition), mais de petites lésions fibrotiques interstitielles dans la région alvéolaire (à 21 jours). Une petite fraction des macrophages alvéolaires recueillis dans le lavage broncho-alvéolaire était reliée par des structures de carbone intercellulaires se prolongeant dans le cytoplasme. Les « ponts de carbone » ont également été observés *in situ*, dans les poumons de rats exposés. Selon les auteurs, ces structures offrent une nouvelle sorte de biomarqueurs de l'exposition aux NTCs facilement identifiable [Mangum *et al.*, 2006].

Mercer *et al.* ont utilisé une préparation de SWCNTs préalablement traités par filtration, sonication prolongée dans l'acétone, re-filtration et dispersion dans un milieu aqueux dont la taille des agglomérats est réduite à moins de 1 μ m en moyenne (\varnothing_{moy} et L_{moy} non spécifiés). Après administration (par aspiration pharyngée) d'une très faible dose de ces SWCNTs dispersés (10 μ g/souris), les SWCNTs se distribuent dans l'interstitium alvéolaire et induisent une réaction inflammatoire transitoire. Ils n'observent cependant pas la formation de granulomes mais une très forte réponse fibrotique après 1 mois [Mercer *et al.*, 2008]. **On peut donc suggérer sur la base de cette étude que les granulomes observés dans d'autres études sont des réponses engendrées par les agglomérats de NTCs.** Ceci sera confirmé par les études réalisées plus tard par inhalation (voir § 3.3.1.1.3).

Porter *et al.* ont étudié la réponse pulmonaire de la souris après administration (par aspiration pharyngée) de MWCNTs (MWCNT-7 de Mitsui ; \varnothing_{moy} : 50 nm ; L_{med} : 4 μ m ; 10-80 μ g/souris) dispersés dans du PBS sans Ca et sans Mg, contenant du glucose, de l'albumine et du surfactant. Ils rapportent la formation de granulomes pulmonaires et d'une réaction fibrosante du poumon détectable dès 7 jours après l'administration. Ces auteurs ont également noté la translocation de SWCNTs vers la plèvre [Porter *et al.*, 2009].

En étudiant la capacité des SWCNTs (\varnothing_{moy} : non précisé ; L_{moy} < 4 μ m) à induire une réaction fibrotique rapide et progressive, sans inflammation persistante, Wang *et al.* ont montré *in vitro* que les SWCNTs stimulaient la prolifération des fibroblastes et induisaient la production de collagène, sans entraîner de dommage cellulaire. L'expression de la métalloprotéinase-9 (MMP-9), une enzyme connue pour son rôle pathogénique dans la fibrose pulmonaire, a aussi été stimulée par les SWCNTs *in vitro* et *in vivo* sur des souris traitées par aspiration pharyngée [Wang *et al.*, 2010].

3.3.1.1.3 Exposition par inhalation

Mitchell *et al.*, ont exposé 14 jours, 6 h/jour, des souris à des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 10-20 nm ; L_{moy} : 5-15 μ m, synthétisés par CVD sur un catalyseur Ni/Fe ; 0,3 ; 1 et 5 mg/m³). Les doses utilisées allaient de 0,3 à 5 mg/m³, correspondant à des doses instillées dans les poumons de 0,2 à 2,7 mg/kg de souris. Des particules noires ont été observées à l'histologie des poumons ainsi que dans le lavage broncho-alvéolaire dans les macrophages alvéolaires des animaux exposés. Cependant, aucune inflammation pulmonaire ni aucune lésion pulmonaire telle que des granulomes ou une fibrose n'a été mise en évidence [Mitchell *et al.*, 2007].

Ces résultats sont confortés par les travaux de Li *et al.*, qui ont comparé les effets d'une exposition à des MWCNTs (Ø_{moy} et L_{moy} non connus) par instillation intratrachéale et par inhalation. Comme dans l'étude de Mitchell (2007), les auteurs n'ont observé aucun signe d'inflammation chez des souris ayant inhalé des MWCNTs à la dose de 32 mg/m^3 durant 8, 16 et 24 jours correspondant à une dose déposée dans les poumons de 0,07 ; 0,14 et 0,21 mg/souris. Seule la présence d'agglomérats de MWCNTs et de cellules aux abords de ces agglomérats a été observée à proximité des parois des bronches sans entraîner d'inflammation. Une légère augmentation de l'épaisseur des parois alvéolaires a également été rapportée suite à ce traitement. Par opposition, après administration par instillation intratrachéale de ce même MWCNT, les mêmes auteurs ont observé la présence de lésions pulmonaires ainsi que l'expression de marqueurs de l'inflammation [Li JG. *et al.*, 2007].

Ces résultats, contradictoires avec ceux observés par instillation/aspiration, semblent indiquer que **l'agglomération des NTCs serait en partie responsable de leur toxicité (granulomes)** ; il semble néanmoins que les NTCs isolés ne soient pas dénués de toxicité. Au contraire, dans l'article de Shvedova (2008) les effets génotoxiques résultant de l'inhalation étaient majorés par rapport à l'aspiration pharyngée (*cf.* 3.3.1.5.1).

Ma-Hock *et al.* ont étudié la réponse pulmonaire de rats exposés pendant 13 semaines (6 h/jour et 5 j/semaine) à une suspension atmosphérique de MWCNTs (MWCNT7000 de Nanocyl®, Ø_{moy} : 5-15 nm ; L_{moy} : 0,1-10 μm ; synthétisés sur un catalyseur Fe/Co) à 0,1 ; 0,5 ou $2,5 \text{ mg/m}^3$ par le nez uniquement. La granulométrie de l'aérosol inhalé par les rats était comprise entre 0,7 et 2,0 μm (diamètre aérodynamique médian en masse). Dans les 2 groupes de dose supérieurs (0,5 et $2,5 \text{ mg/m}^3$), les auteurs ont observé la formation de granulomes pulmonaires ainsi qu'une lipoprotéinose intra-alvéolaire. A la plus faible dose ($0,1 \text{ mg/m}^3$), les auteurs observaient encore une faible inflammation granulomateuse au niveau alvéolaire, ainsi que dans les ganglions drainant le poumon. Le NOEL dans cette étude était donc inférieur à $0,1 \text{ mg/m}^3$ [Ma-Hock *et al.*, 2009].

Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, ont exposé des rats par inhalation pendant 6 h à 11 ou 241 mg/m^3 de MWCNTs (Baytubes®) (Ø_{moy} : 10-16 nm ; L_{moy} : 200-1 000 μm ; surface : $253 \text{ m}^2/\text{g}$) contenant (MWCNT+) ou non (MWCNT-) du Cobalt et les ont observés pendant 3 mois (*étude déjà citée au § 3.1.4*). Ils ont remarqué une inflammation pulmonaire concentration-dépendante et régressant dans le temps ainsi qu'une clairance plus rapide du Cobalt contenu dans les MWCNT+ par rapport à la régression de l'inflammation. D'après les auteurs, la réponse à l'inhalation de MWCNTs serait principalement due à la structure d'assemblage des MWCNTs et non aux impuretés du catalyseur [Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2009].

Pauluhn a étudié la réponse pulmonaire chez des rats exposés pendant 13 semaines par inhalation (nez seulement, 6 h/j et 5 j/semaine) à un aérosol de MWCNTs micronisés (Baytubes®) (Ø_{moy} : 10 nm ; L_{moy} : 200-300 μm) aux doses de 0,1 ; 0,4 ; 1,5 et 6 mg/m^3 (*étude déjà citée au § 3.1.4*). L'examen histopathologique révélait des lésions inflammatoires et un remodelage des voies respiratoires supérieures (hyper- et métaplasie des cellules en gobelet, remodelage focal des cornets) et du tractus respiratoire profond (inflammation broncho-alvéolaire et fibrose interstitielle) à partir de $0,4 \text{ mg/m}^3$. Des granulomes et de l'hyperplasie broncho-alvéolaire progressive avec le temps étaient notés à la dose de 6 mg/m^3 . Les MWCNTs ne se désagrègent pas dans les alvéoles [Pauluhn, 2010a]. L'auteur note que ces lésions sont compatibles avec une réaction de type « surcharge alvéolaire »⁴⁶ que l'on observe avec d'autres particules faiblement solubles. La masse volumique des Baytubes® étant particulièrement faible ($0,11\text{-}0,31 \text{ g/cm}^3$), les effets surviennent pour des doses massiques particulièrement faibles. Si les résultats de cette étude sont compatibles avec l'hypothèse d'un mécanisme de surcharge, ils ne la démontrent cependant pas. Les auteurs ont mis en évidence une concentration sans effet observé (NOEC: *No observed effect concentration*) de $0,1 \text{ mg/m}^3$, les conduisant à proposer une valeur limite d'exposition professionnelle de $0,050 \text{ mg/m}^3$ [Pauluhn, 2010b].

⁴⁶ Les réactions de **surchage alvéolaire** sont généralement considérées comme consécutives à une surcharge des macrophages alvéolaires, un phénomène dépendant du volume (plutôt que de la masse) de particules accumulées dans les alvéoles.

3.3.1.2 Asthme bronchique, bronchiolite et pneumonie

3.3.1.2.1 Exposition par instillation intratrachéale

Huczko *et al.* ont exposé des cochons d'Inde à différents types de MWCNTs par instillation intratrachéale (dose unique de 15 mg). Les dimensions des MWCNTs testés n'ont pas été précisées. Quatre-vingt-dix jours après l'administration, les auteurs ont observé une bronchiolite oblitérante avec organisation pneumonique accompagnée d'une réaction non spécifique ressemblant à une pneumonie interstitielle desquamative, mais sans fibrose ou avec une légère fibrose autour des bronchioles. Les auteurs ont également observé une augmentation de la résistance à la dilatation pulmonaire et une infiltration de l'espace broncho-alvéolaire par des cellules inflammatoires chez certains animaux. En plus d'une infiltration de cellules inflammatoires autour des vaisseaux, des bronchioles et dans l'espace interstitiel, une atélectasie⁴⁷ centrale et périphérique, de l'emphysème et une exsudation alvéolaire ont été observés. Des différences au niveau de ces effets ont été constatées selon le type de MWCNT administré. Des nanotubes ont été retrouvés à l'intérieur des macrophages alvéolaires. Les auteurs concluent que la durée de l'exposition aux MWCNTs administrés par instillation intratrachéale est cruciale pour induire des effets mesurables dans les poumons [Huczko *et al.*, 2005].

Grubek-Jaworska *et al.* ont étudié *in vivo* l'effet d'une instillation intratrachéale unique (12,5 mg) de quatre types de MWCNTs et de SWCNTs commercialement disponibles avec de très faibles teneurs en fer (< 0,01 ppm) à des groupes de 4-5 cochons d'Inde. Après 3 mois, ils ont remarqué que tous les NTCs conduisaient à une pneumonie avec une réaction focale non-spécifique interstitielle ressemblant à de la pneumonie sans fibrose ou avec une faible fibrose péribronchiolaire chez tous les animaux exposés mais pas chez les contrôles. La concentration d'IL-8 dans les fluides du lavage broncho-alvéolaire a augmenté pour un seul des 4 NTCs. Le nombre de macrophages, de lymphocytes et de neutrophiles a significativement augmenté pour un autre des 4 NTC. Finalement, pour un troisième des 4 NTCs, les auteurs ont mesuré une augmentation des macrophages et des éosinophiles. Il est intéressant de constater que les dépôts de carbone se situaient principalement au niveau des bronchioles et étaient presque totalement absents des alvéoles. Les auteurs n'ont pas remarqué de granulomes dans le tissu pulmonaire. Ils ont également noté une tendance des nanotubes à former des agrégats (cordes/tiges) et des obstructions de certaines voies respiratoires ont été détectées chez certains cochons d'Inde [Grubek-Jaworska *et al.*, 2006].

3.3.1.2.2 Exposition par inhalation

Ryman-Rasmussen *et al.* ont exposé des souris (sensibilisées ou non par de l'ovalbumine pour obtenir un modèle courant de souris asthmatiques) par inhalation à 100 mg/m³ de MWCNTs (\varnothing_{moy} : 10-30 nm ; L_{moy} : 0,5-40 μm ; synthétisés par CVD sur un catalyseur Ni/Lanthanum) pendant 6 heures. Ils ont observé les effets toxicologiques à 1 jour ou 14 jours post-inhalation. Un effet synergique des MWCNTs et de l'ovalbumine a été mis en évidence. Il est à l'origine d'une fibrose des voies aériennes à 14 jours résultant d'une augmentation de TGF- β 1 et du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, de l'anglais *platelet-derived growth factor*). Aucune fibrose n'a été observée chez les souris recevant uniquement l'ovalbumine ou les MWCNTs. Ces résultats suggèrent que les individus présentant préalablement des inflammations allergiques (de type asthme) seraient plus susceptibles de développer des fibroses après avoir inhalé des MWCNTs [Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009].

⁴⁷ **Atélectasie** : Affaissement des alvéoles de tout ou partie d'un des deux poumons caractérisé par l'absence de ventilation, alors que la circulation sanguine de la partie du poumon concernée par l'atélectasie continue à fonctionner normalement.

3.3.1.3 Effets sur le système cardio-vasculaire

3.3.1.3.1 Exposition par aspiration pharyngée

Li *et al.* ont exposé des souris (C57BL/6) à des nanotubes de carbone (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) par aspiration pharyngée (dose unique ; 0,5, 1 et 2 mg/kg). Les auteurs ont observé des dommages à l'ADN mitochondrial de l'aorte (paramètre dépendant du stress oxydant ; relation dose-dépendante) 7, 28 et 60 jours après l'administration. Les dommages oxydatifs ont été accompagnés d'une altération dans l'expression des gènes responsables de la réponse inflammatoire dans le cœur (MCP-1 et VCAM-1). Selon les auteurs, les effets observés dans le cœur des souris pourraient être un effet direct des NTCs se retrouvant dans la circulation systémique ou un effet indirect de l'inflammation des poumons. Les auteurs concluent que les NTCs provoquent des effets qui peuvent être des facteurs de prédisposition à l'athérogénèse (formation de plaques d'athérosclérose dans les artères) [Li Z. *et al.*, 2005].

3.3.1.3.2 Exposition par instillation intratrachéale

Li *et al.* ont exposé des souris ayant un taux élevé de cholestérol sanguin (ApoE^{-/-}) à des SWCNTs par instillation pharyngée à des concentrations de 10 et 40 $\mu\text{g/souris}$. Ils ont noté une activation de l'hème oxygénase-1 (un marqueur de stress oxydant dans le poumon, l'aorte et le tissu cardiaque), 7, 28 et 60 jours après l'exposition. Les souris ont développé des dommages de l'ADN aortique. Les auteurs ont également évalué l'effet d'une exposition répétée chez 10 souris (20 $\mu\text{g/souris/semaine}$ pendant 8 semaines). Le pourcentage de la surface de l'aorte recouverte de plaques d'athérosclérose était significativement plus élevé chez les souris ayant été exposées aux SWCNTs comparativement aux contrôles. Une augmentation significative des lésions athérosclérotiques dans les artères brachio-céphaliques a aussi été observée. Les auteurs concluent que l'exposition aux SWCNTs accélère la progression de l'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-} [Li Z. *et al.*, 2006 et 2007].

3.3.1.3.3 Exposition par inhalation

Les effets cardiovasculaires observés suite à l'inhalation de particules pourraient être liés à une perturbation du système nerveux autonome [Hoet *et al.*, 2004 ; Seaton et Donaldson, 2005].

3.3.1.4 Effets immulogiques et allergiques

Dans l'étude de Mitchell *et al.* (citée au § 3.3.1.1.3), des souris ont été exposées par inhalation pendant 7 et 14 jours, 6 h/jour, à des MWCNTs (\emptyset_{moy} : 10-20 nm ; L_{moy} : 5-15 μm). Les auteurs ont observé une immunosuppression systémique (diminution des réponses humorale et cellulaire). A 1 mg/m^3 , l'activité des cellules NK ("Natural killers", tueuses naturelles) était diminuée. L'expression génique de l'IL-10 et de la NADPH oxydo-réductase était augmentée dans la rate [Mitchell *et al.*, 2007]. Une étude ultérieure a indiqué que l'immunosuppression systémique observée après l'administration de MWCNTs pourrait être médiée par le TGF- β libéré par le poumon [Mitchell *et al.*, 2009].

Outre la formation de granulomes pulmonaires, Park *et al.* ont observé que l'administration intratrachéale d'une dose de MWCNTs (Cat No. 659258 de chez Aldrich, \emptyset_{moy} : 110-170 nm ; L_{moy} : 5-9 μm instillés à la dose de 5, 20 ou 50 mg/kg) chez la souris induisait dès les premières 24 heures une augmentation du type Th2 de cytokines (IL-4, IL-5, et IL-10) par rapport au type Th1 (IL-12 et IFN- γ) dans le poumon et le sang périphérique, accompagnée d'une prolifération des lymphocytes B dans la rate et le sang ainsi que d'une augmentation des immunoglobulines E (IgE). **Les auteurs concluaient que les NTCs auraient le potentiel de déclencher des réponses allergiques** [Park *et al.*, 2009].

3.3.1.5 Génotoxicité

La liste et le résumé des études *in vivo* relatives à la génotoxicité des NTCs figurent dans la seconde partie du tableau qui se trouve en Annexe 1.

3.3.1.5.1 Exposition par aspiration pharyngée et inhalation

Dans une étude réalisée chez la souris, les effets pulmonaires de SWCNTs (Ø_{moy} : 240 nm ; L_{moy} : 100-1 000 μm) administrés par aspiration pharyngée ou par inhalation (pendant 4 jours) ont été comparés, à dose équivalente, après des délais allant jusqu'à 28 jours post-exposition. Les résultats ont montré l'existence de mutations du gène *k-ras*⁴⁸ (un biomarqueur tumoral) dans le poumon des souris exposées par inhalation, mais non après dépôt pharyngé des particules. Ces différences sont interprétées par les auteurs relativement à l'état de dispersion des SWCNTs, plus agrégés lorsqu'ils sont déposés par voie pharyngée et plus individualisés par inhalation [Shvedova *et al.*, 2008].

3.3.1.5.2 Exposition par instillation intratrachéale

Une étude effectuée chez des rats exposés (par instillation intratrachéale) à des MWCNTs a mis en évidence des micronoyaux dans des cellules pulmonaires, pneumocytes de type II, isolés 3 jours après exposition, suggérant un potentiel génotoxique [Muller *et al.*, 2008].

3.3.2 Etude de la toxicité par voie orale

3.3.2.1 Génotoxicité

La liste et le résumé des études *in vivo* relatives à la génotoxicité des NTCs figurent dans la seconde partie du tableau qui se trouve en Annexe 1.

Folkmann *et al.* ont évalué l'oxydation de la déoxyguanosine dans différents tissus (foie, poumon, colon) après administration de SWCNTs (Ø_{moy} : 0,9-1,7 nm ; $\text{L}_{\text{moy}} < 1\mu\text{m}$) par gavage chez des rats femelles. Une oxydation a été mise en évidence dans le foie et le poumon, mais pas dans les cellules épithéliales du colon. Ces résultats suggèrent une translocation des particules dans le foie et le poumon, pouvant être associée à une réaction inflammatoire, et pose la question de l'atteinte intestinale par ces particules [Folkmann *et al.*, 2009].

Dans une autre publication, les urines de rats ont été recueillies après administration de SWCNTs ($\text{Ø}_{\text{moy}} < 2\text{ nm}$; L_{moy} : 4-15 μm) et de MWCNTs (Ø_{moy} : 10-30 nm ; L_{moy} : 1-2 μm), puis testées pour leur effet mutagène sur des bactéries (test de Ames). Aucun effet mutagène n'a été mis en évidence ce qui peut être dû soit à l'absence d'activité des particules sur les voies urinaires, soit à une cinétique non appropriée pour la détection de métabolites ou de substances mutagènes [Szendi et Varga, 2008].

3.3.3 Etude de la toxicité par voie cutanée

Les effets d'une exposition cutanée aux NTCs sont très peu connus. Pourtant, les NTCs sont hydrophobes et ils pourraient traverser les barrières biologiques et notamment la peau.

Toutefois, l'exposition aux NTCs par voie cutanée est probablement faible en raison du temps de dépôt long des NTCs sur les surfaces. Néanmoins, elle ne peut pas être négligée dans le cas de manipulations directes des NTCs au poste de travail. Si on prend l'exemple des nanoparticules de TiO_2 qui sont incorporées à des crèmes solaires, la plupart des études ne montrent pas [Cross *et al.*, 2007 ; Lademann *et al.*, 1999] ou ne montrent qu'une faible pénétration de ces nanoparticules dans l'épiderme, sans qu'il y ait passage dans le derme lorsque celui-ci est intact [Alvarez-Román

⁴⁸ Le gène **k-ras** joue un rôle important dans la croissance cellulaire et la prolifération des tumeurs.

et al., 2004]. Ainsi l'épiderme semble être une barrière efficace pour empêcher la pénétration des nanomatériaux, mais à condition que celui-ci ne soit pas lésé.

3.3.3.1 Cytotoxicité

Une exposition topique de souris glabres immuno-compétentes (SKH-1) à des SWCNTs (Ø_{moy} : 1,5 nm ; L_{moy} : 1-100 μm) bruts (pendant 5 jours avec une dose quotidienne de 40, 80, ou 160 $\mu\text{g/souris}$) a causé un stress oxydant, l'épuisement du glutathion, l'oxydation des protéines thiols et carbonyles, l'augmentation de l'activité myéloperoxydase⁴⁹, une prolifération de cellules dermiques et un épaississement de la peau résultant de l'accumulation de leucocytes⁵⁰ polynucléaires (PMN) et de mastocytes⁵¹. Ces données indiquent qu'une exposition topique à des SWCNTs non purifiés induit l'apparition de radicaux libres, un stress oxydant et une inflammation à l'origine d'une toxicité dermique [Murray *et al.*, 2009].

3.3.3.2 Effets sur la peau et les muqueuses

Dans l'étude de Sato, une dose de 0,1 mg de nanotubes de carbone a été implantée dans le tissu sous-cutané de rats. Ni nécrose tissulaire ni inflammation n'ont été notées. Cependant les auteurs ont observé la formation de granulomes [Sato *et al.*, 2005].

Yokoyama *et al.* (2005) ont implanté des amas de nanotubes de carbone (Ø_{moy} : 30-100 nm ; L_{moy} : 0,1-1 μm) dans le tissu sous-cutané de rats (Wistar). Les doses administrées n'ont pas été précisées. Une semaine après l'implantation, les auteurs ont observé du tissu de granulation autour des amas de NTCs et une réponse inflammatoire semblable à celle observée lors de la formation de granulomes. Après quatre semaines, les amas de NTCs étaient entourés de tissus fibreux. Aucune réponse inflammatoire sévère (nécrose, dégénérescence des tissus ou infiltration de neutrophiles) n'a été notée autour des NTCs au cours de l'étude. Les NTCs ont été observés dans les espaces intercellulaires et intracellulaires une semaine après l'implantation. Certains NTC ont également été observés dans les lysosomes des macrophages. Les résultats suggèrent que les NTCs ne présentent pas de toxicité aiguë dans le tissu sous-cutané [Yokoyama *et al.*, 2005].

Deux autres études *in vivo* ont étudié les effets des NTCs après application cutanée [Huczko *et al.*, 2001a ; Kishore *et al.*, 2009].

Huczko *et al.* ont étudié les effets de l'exposition aux NTCs sur la peau, en appliquant un filtre saturé d'une solution contenant des NTCs (Ø_{moy} , L_{moy} et dose non précisés) à 40 volontaires pendant 96 h. Aucun signe d'irritation n'a été constaté. L'instillation oculaire d'une suspension aqueuse de nanotubes chez des lapins pendant 24, 48 et 72 h n'a pas non plus causé d'irritation [Huczko *et al.*, 2001a].

De même, Kishore *et al.* ont étudié l'exposition de lapins par voie cutanée avec deux types de MWCNTs (respectivement $\text{Ø}_{\text{int. moy}}$: 3-8 nm ; $\text{Ø}_{\text{ext. moy}}$: 140 \pm 30 nm ; L_{moy} : 5-8 μm et $\text{Ø}_{\text{int. moy}}$: 2-6 nm ; $\text{Ø}_{\text{ext. moy}}$: 10-15 nm ; L_{moy} : 1-10 μm). Une dose de 0,5 g de chaque type de MWCNT a été appliquée sur la peau des lapins. Aucune irritation (ni érythème ni œdème) n'a été observée après 60 mn et 24 h d'exposition. L'observation de la peau au microscope n'a révélé aucune lésion. Les auteurs concluent que les deux tailles de MWCNTs ne sont pas irritantes pour la peau. Dans la même étude, les auteurs ont appliqué 18 mg des deux types de MWCNTs dans le sac conjonctival de lapins. Des irritations (rougeur conjonctivale réversible et larmoiement) ont été observées de 1 h à 72 h après l'exposition. L'observation a duré jusqu'à ce que les irritations disparaissent au bout de 96 h. L'observation des yeux au microscope n'a révélé aucune lésion. Les auteurs concluent que les deux tailles de MWCNTs sont faiblement irritantes pour les yeux [Kishore *et al.*, 2009].

⁴⁹ La **myéloperoxydase** est une enzyme de défense aux capacités oxydantes.

⁵⁰ Les **leucocytes** ou globules blancs sont des cellules du système immunitaire.

⁵¹ Les **mastocytes** sont des cellules du système immunitaire.

3.3.3.3 Effets immunologiques et allergiques

Dans l'étude de Huczko citée au paragraphe précédent (*cf.* § 3.3.3.2) l'application cutanée d'un filtre saturé avec des nanotubes n'a pas causé d'allergie chez les volontaires [Huczko *et al.*, 2001a].

3.3.4 Etude de la toxicité par d'autres voies

3.3.4.1 Reprotoxicité

Bai *et al.* ont montré que des injections intraveineuses répétées de MWCNTs (Ø_{moy} et L_{moy} non disponibles) mis en suspension dans l'eau pouvaient causer des dommages réversibles sur les testicules de souris mâles sans affecter leur fertilité. Les NTCs s'accumulent dans les testicules, créant un stress oxydant et diminuant l'épaisseur de l'épithélium séminifère des testicules au 15^{ème} jour. Néanmoins, les dommages sont réparés au 60^{ème} et au 90^{ème} jour. La quantité, la qualité et l'intégrité du sperme ainsi que le niveau de 6 hormones sexuelles majeures n'ont pas été significativement affectés au cours de la période de 90 jours. La fertilité des souris mâles traitées n'a pas été affectée. Le taux de gestation et le nombre de gestations menées à terme chez les souris femelles qui se sont accouplées avec des souris traitées mâles ne diffèrent pas de ceux qui se sont accouplées avec des souris mâles non traités [Bai *et al.*, 2010].

3.3.4.2 Génotoxicité

La liste et le résumé des études *in vivo* relatives à la génotoxicité des NTCs figurent dans la seconde partie du tableau qui se trouve en Annexe 1.

Patlolla *et al.* ont exposé des souris par voie intrapéritonéale (0,25 ; 0,5 et 0,75 mg/kg) à des MWCNTs (Ø_{moy} : 15-30 nm ; L_{moy} : 15-20 μm), fonctionnalisés ou non fonctionnalisés, afin de déterminer les effets sur les cellules de la moelle osseuse. Après un délai post-traitement de 24 h une génotoxicité, caractérisée par une augmentation significative dose-dépendante d'aberrations chromosomiques structurales, de micronoyaux et de cassures de l'ADN (test des comètes) a été observée. L'effet des MWCNTs fonctionnalisés était supérieur à celui des MWCNTs non fonctionnalisés pour l'induction de micronoyaux et de cassures de l'ADN [Patlolla *et al.*, 2010].

3.3.4.3 Cancérogénicité : mésothéliomes

Poland *et al.* ont montré que l'exposition du tissu mésothélial qui tapisse la cavité abdominale des souris (comme modèle de substitution pour le tissu mésothélial qui tapisse la cage thoracique) à des MWCNTs (Ø_{moy} variant entre 15 et 160 nm, et L_{moy} variable) provoque les mêmes effets pathogènes et dépendants de la longueur des fibres qu'une exposition à l'amiante (du type inflammation et formation de lésions granulomateuses) [Poland *et al.*, 2008].

Takagi *et al.* ont exposé des souris hétérozygotes p53(+/-)⁵² (connues pour être sensibles à l'amiante) par injection intrapéritonéale unique à des MWCNTs (Ø_{moy} : 100 nm et L_{moy} : 1-5 μm , contenant près de 30 % de nanotubes longs > 5 μm ; 3 mg/animal), à de l'amiante et à des fullerènes. Ils ont observé, à la fin de leur étude (25 semaines), une réponse mésothéliale incluant des adhérences fibreuses péritonéales de sévérité modérée à grave, de même que des tumeurs péritonéales, des mésothéliomes⁵³ et la mort de certains animaux. L'amiante a conduit aux mêmes

⁵² Les **souris déficientes en p53** sont extrêmement sensibles à des agents cancérogènes en raison d'un déficit de réparation des dommages génotoxiques et / ou d'induction de l'apoptose.

⁵³ Le **mésotéliome** est une forme rare et virulente de cancer affectant les cellules mésothéliales qui constituent le revêtement des poumons (la plèvre), de la cavité abdominale (le péritoine) ou l'enveloppe du cœur (le péricarde). Le mésothéliome pleural est causé par l'exposition à des fibres minérales (comme l'amiante).

effets, mais de façon moins sévère. Enfin, le fullerène n'a pas conduit à ces effets [Takagi *et al.*, 2008].

Muller *et al.* ont étudié la cancérogénicité des MWCNTs dans la cavité intrapéritonéale de rats. L'incidence du mésothéliome et d'autres tumeurs a été enregistrée dans trois groupes de rats (Wistar) mâles ayant reçu une injection intrapéritonéale unique de MWCNTs (\varnothing_{moy} : 11,3 μm ; L_{moy} ~0,7 μm) avec (2 ou 20 mg de MWCNTs⁺/animal) ou sans défaut (20 mg de MWCNTs⁻/animal). Deux groupes supplémentaires de 26 rats ont été utilisés comme contrôles positifs (2 mg d'amiante/animal) et négatif (contrôle du solvant). Au bout de vingt-quatre mois, alors que l'amiante a clairement induit une réponse carcinogénique (34,6 % des animaux atteints de mésothéliome contre 3,8 % dans le groupe témoin négatif), les MWCNTs, avec ou sans défauts structurels, n'ont pas induit de mésothéliome dans les conditions expérimentales mises en œuvre (respectivement 4, 0 et 6% de mésothéliomes dans les groupes à 2 et 20 mg de MWCNTs⁺/animal et dans le groupe à 20 mg de MWCNTs⁻/animal). L'incidence des autres tumeurs n'était pas non plus significativement augmentée. Ainsi, l'hypothèse de départ selon laquelle l'activité carcinogène des MWCNTs avec défaut était différente de celle sans défaut n'a pas été vérifiée dans cette expérience [Muller *et al.*, 2009].

Sakamoto *et al.* ont également évalué la cancérogénicité de MWCNTs (\varnothing_{moy} et L_{moy} non précisés, les mêmes que ceux utilisés dans l'étude de Takagi de 2008) chez des rongeurs. Des MWCNTs (1 mg/kg de poids corporel, 7 animaux), de l'amiante (2 mg/kg de poids corporel, 10 animaux) et du solvant seul (2% carboxyméthyl de cellulose, 5 animaux) ont été administrés à des rats (Fischer 344) lors d'une injection intrascrotale unique. Les rats ont été autopsiés immédiatement après leur mort, une fois devenus moribonds ou à la fin de la période maximale d'observation (52 semaines). Au bout de 37 à 40 semaines, 6 (soit 87,5 %) des animaux traités avec des MWCNTs étaient morts ou moribonds en raison de mésothéliomes disséminés dans leur cavité intrapéritonéale. Un seul rat du groupe traité avec des MWCNTs a survécu jusqu'à la fin de l'expérience. En revanche, les 10 animaux traités avec de l'amiante et les 5 du groupe témoin négatif ont tous survécu 52 semaines sans aucun changement particulier, à l'exception d'une distribution de l'amiante dans différents organes (foie, ganglions lymphatiques). Ces résultats mettent en évidence le pouvoir cancérogène élevé des MWCNTs chez le rat, dans les conditions expérimentales mises en œuvre [Sakamoto *et al.*, 2009].

Synthèse relative à la toxicité des NTCs *in vivo*

EXPOSITION PAR VOIE RESPIRATOIRE

Inflammations et lésions pulmonaires

Les études expérimentales (une vingtaine d'études analysées) menées sur la souris, le rat et le cochon d'Inde ont montré que l'administration de SWCNTs ou de MWCNTs par instillation intratrachéale pouvait provoquer une inflammation, des granulomes au niveau des poumons, de la fibrose, voire même la mort. Les morts observés, du moins dans deux études sur trois, ont été attribuées à un encombrement mécanique des voies respiratoires supérieures [Carrero-Sanchez *et al.*, 2006 ; Warheit *et al.*, 2004]. Différents auteurs ont montré l'apparition de granulomes au niveau des poumons des rongeurs 1 semaine à 3 mois après administration par instillation intratrachéale à de fortes doses de SWCNTs : 0,1 à 0,5 mg/souris ou rat [Lam *et al.*, 2004 ; Warheit *et al.*, 2004]. Une réponse similaire a été observée chez la souris traitée par aspiration pharyngée avec de beaucoup plus faibles doses de SWCNTs (10 à 40 µg/souris) [Shvedova *et al.*, 2005]. Les lésions granulomateuses ont été associées à la présence d'agglomérats de NTCs. Dans certains cas, associée aux granulomes, une réaction fibrosante peut se développer, dont les origines sont encore mal connues. Cette réaction a été observée à l'emplacement de la lésion granulomateuse et sur des sites éloignés [Carrero-Sanchez *et al.*, 2006 ; Lam *et al.*, 2004 ; Muller *et al.*, 2005 ; Shvedova *et al.*, 2005 ; Warheit *et al.*, 2004 ; Mangum *et al.*, 2006]. La fibrose située à distance des lésions granulomateuses serait vraisemblablement due à des particules de NTCs isolées ou moins agrégées [Shvedova *et al.*, 2005].

Bien que l'induction de fibrose interstitielle et de granulomes pulmonaires chez le rat ait aussi été décrite pour d'autres fibres artificielles ou naturelles [Lemaire *et al.*, 1989], le démarrage rapide et l'absence de persistance de l'inflammation associée à de la fibrose sont considérés comme atypiques [Shvedova *et al.*, 2005].

Il est important de souligner que dans les études où l'administration de NTCs a été réalisée par instillation intratrachéale ou aspiration pharyngée, ce mode d'administration n'est pas physiologique et que les nanotubes étaient, au moins partiellement, sous la forme d'agrégats ou de faisceaux de gros diamètre. En effet, dans ces études, les NTCs ont été dispersés dans du PBS [Shvedova *et al.*, 2005], du PBS ou du NaCl en présence de Tween 80 [Muller *et al.*, 2005 ; Warheit *et al.*, 2004] ou encore en présence de sérum [Lam *et al.*, 2004], d'albumine [Elgrabli *et al.*, 2008b], d'acétone [Mercer *et al.*, 2008], ce qui ne permet pas la production d'agglomérats respirables, c'est-à-dire de taille inférieure à 10 µm voire 5 µm pour le rat, ce qui peut limiter la pertinence de ce mode d'administration des NTCs. Considérant qu'une proportion importante de ces agrégats n'aurait pas été respirable, les résultats de ces études ne sont pas forcément représentatifs des conditions physiologiques de l'inhalation. En effet, ces agglomérats de NTCs peuvent mener à la formation d'artéfacts, comme par exemple le développement de granulomes de type « corps étranger » qui ont été observés dans les grosses bronches chez le rat dans les premières études [Warheit *et al.*, 2004 ; Muller *et al.*, 2005].

Dans deux des études *in vivo* précédemment citées, des SWCNTs ont été comparés à une dose équivalente de noir de carbone de dimension nanométrique ; et dans les deux cas, aucune fibrose ni aucun granulome n'a été observé avec les animaux traités avec le noir de carbone [Lam *et al.*, 2004 ; Shvedova *et al.*, 2005]. Ceci souligne l'importance des caractéristiques physico-chimiques sur la toxicité des particules. Ces effets semblent davantage dus aux propriétés de surface et au facteur de forme (rapport longueur sur diamètre) des particules, qu'à leur taille nanométrique elle-même.

Sur le plan inflammatoire, différents travaux ont montré une augmentation de neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et macrophages récupérés dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) de souris traitées par des SWCNTs [Lam *et al.*, 2004 ; Shvedova *et al.*, 2005], ou de rats traités par des MWCNTs [Muller *et al.*, 2005], dès 24 h après l'administration. Ces observations sont associées à l'augmentation de la quantité de cytokines pro-inflammatoires et notamment du TNF-

α , de l'IL-1- β et de l'IL-8 [Muller *et al.*, 2005 ; Shvedova *et al.*, 2005].

Les effets pulmonaires (granulomes, inflammations, *etc.*) ont été observés après inhalation avec une sévérité et une incidence dose-dépendantes [Ma-Hock *et al.*, 2009 ; Ellinger-Ziegelbauer et Pauluhn, 2009] et semblent partiellement réversibles.

Plusieurs résultats semblent indiquer que l'agglomération des NTCs serait en partie responsable de leur toxicité (formation de granulomes) [Mercer *et al.*, 2008 ; Li JG. *et al.*, 2007].

Une translocation des NTCs vers la plèvre a été relevée par plusieurs auteurs, dont Porter [Porter *et al.*, 2009].

Les résultats de ces études suggèrent que dans le cas de nanotubes dont la longueur dépasse 20 μm et dont la concentration est suffisante, on peut s'attendre à rencontrer les mêmes types d'effets que ceux observés suite à une exposition à des fibres minérales biopersistantes (par exemple l'amiante), c'est-à-dire la fibrose, le cancer, des lésions pleurales et le mésothéliome [Donaldson *et al.*, 2006].

Les résultats des études *in vivo* relatives aux inflammations et aux lésions pulmonaires dues aux NTCs varient selon les concentrations choisies, le mode d'exposition (aspiration pharyngée, instillation intratrachéale ou inhalation) et la durée d'exposition notamment, montrant la complexité de l'étude de la toxicité des NTCs et la nécessité de prendre en compte de multiples paramètres.

Asthme bronchique, bronchiolites et pneumonies

Trois études ont porté sur les effets des NTCs sur l'asthme bronchique, ou leur capacité d'induire de la bronchiolite ou des pneumonies. Dans les deux premières, l'exposition a été réalisée par instillation intratrachéale chez des cochons d'Inde [Huczko *et al.*, 2005 ; Grubek-Jaworska *et al.*, 2006] et dans la troisième, l'exposition a été réalisée par inhalation chez des souris [Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009].

Les résultats de ces trois études sont « positifs » et suggèrent que les NTCs ont la capacité de provoquer des problèmes respiratoires. De plus, les individus présentant préalablement des inflammations allergiques (de type asthme) seraient davantage enclins à développer de la fibrose après avoir inhalé des MWCNTs que les autres [Ryman-Rasmussen *et al.*, 2009].

Effets sur le système cardiovasculaire

Cinq études portant sur les effets des NTCs sur le système cardiovasculaire de la souris ont été considérées. Dans la première, l'exposition a été réalisée par aspiration pharyngée [Li Z. *et al.*, 2005] et dans deux autres, l'exposition a été réalisée par instillation intratrachéale [Li Z. *et al.*, 2006 et 2007], enfin dans les deux dernières, l'exposition a été réalisée par inhalation [Hoet *et al.*, 2004 ; Seaton et Donaldson, 2005].

Les résultats de ces études sont « positifs » et suggèrent que les NTCs provoquent des effets qui peuvent être des facteurs de prédisposition à l'athérogénèse et accélèrent la progression de l'athérosclérose chez les souris ayant un taux élevé de cholestérol sanguin (ApoE^{-/-}).

Effets immunologiques et allergiques

Mitchell *et al.* ont observé une immunosuppression systémique (diminution des réponses humorale et cellulaire) chez des souris exposées par inhalation à des MWCNTs [Mitchell *et al.*, 2007]. Une étude ultérieure a indiqué que celle-ci était probablement médiée par le TGF- β libéré par le poumon [Mitchell *et al.*, 2009].

En outre, Park *et al.* considèrent que les NTCs auraient le potentiel de déclencher des réponses allergiques [Park *et al.*, 2009].

Génotoxicité

Deux études ont porté sur les effets génotoxiques des NTCs au niveau pulmonaire. L'une a porté sur des souris exposées à des SWCNTs (par aspiration pharyngée ou par inhalation) pendant 4 jours [Shvedova *et al.*, 2008] et l'autre sur des rats exposés (par instillation intratrachéale) à des MWCNTs pendant 3 jours [Muller *et al.*, 2008].

Les résultats de ces deux études sont « positifs » et suggèrent un potentiel génotoxique des NTCs.

Les données obtenues in vivo confortent les résultats obtenus in vitro (cf. § 3.2.2).

Ainsi, après exposition par inhalation, les NTCs semblent clairement avoir la capacité de provoquer des effets délétères (inflammations et lésions pulmonaires, asthme bronchique, bronchiolites et pneumonies, problèmes cardiovasculaires, effets immunologiques et allergiques, etc.). Néanmoins, les premières évaluations (en milieu professionnel) laissent présager une exposition par inhalation faible, suggérant un risque global faible. En outre, la plupart des applications à base de nanotubes de carbone concernent des matériaux composites, ce qui réduit davantage l'exposition aux NTCs libres. Toutefois, en attendant de mieux caractériser les risques liés aux nanotubes de carbone, il est nécessaire de mettre en œuvre toutes les précautions qui s'imposent.

EXPOSITION PAR VOIE ORALE

Malgré l'augmentation croissante du nombre de publications concernant la toxicité des NTCs, peu d'informations relatives à la voie orale sont disponibles.

Génotoxicité

Seules deux études sur la génotoxicité des NTCs après une exposition par voie orale (réalisées par gavage chez la souris ou le rat) ont été trouvées dans les bases de données, et prises en compte dans la présente synthèse. Ces deux études ont été réalisées sur du court terme (24 h post-exposition). L'une a montré un potentiel d'oxydation de l'ADN au niveau du poumon et du foie, mais pas dans les cellules épithéliales du colon [Folkmann *et al.*, 2009] ; l'autre a testé un effet à distance (excrétion urinaire de substances mutagènes) qui n'a pas montré d'effet des NTCs [Szendi et Varga, 2008].

Ces résultats ne sont pas suffisants pour conclure quant à la toxicité des NTCs par voie orale.

EXPOSITION PAR VOIE CUTANEE

Malgré l'augmentation croissante du nombre de publications concernant la toxicité des NTCs, peu d'informations relatives à la voie cutanée sont disponibles.

Cytotoxicité

Une étude a rapporté l'apparition de radicaux libres, un stress oxydant et une inflammation à l'origine d'une toxicité dermique [Murray *et al.*, 2009].

Ces résultats sont confortés par les tests de cytotoxicité réalisés in vitro sur des modèles de cellule de la peau (cf. § 0).

Effets sur la peau et les muqueuses

Deux études *in vivo* ont été réalisées chez le rat, dans lesquelles les auteurs ont déposé des implants de NTCs derrière la peau, mimant ainsi un passage cutané. Ni nécrose tissulaire ni inflammation n'ont été notées. Cependant les auteurs ont observé la formation de granulomes [Sato *et al.*, 2005 ; Yokoyama *et al.*, 2005].

D'autres études indiquent même que les NTCs ne sont pas irritants pour la peau [Huczko *et al.*, 2001a ; Kishore *et al.*, 2009].

Effets immunologiques et allergiques

Une seule étude relative aux effets immunologiques et allergiques a été analysée. Elle a consisté en l'application d'un filtre saturé avec des NTCs chez des volontaires et n'a causé aucune allergie [Huczko *et al.*, 2001a].

Cependant, ces résultats négatifs ne sont pas suffisants pour conclure quant aux effets immunologiques et allergiques des NTCs par voie cutanée.

Ainsi, les nanotubes de carbone ne présentent pas d'effet irritant ou de potentiel allergisant significatif lors d'une application cutanée ou sous-cutanée ou lors de tests oculaires chez le lapin. Cette absence de résultat positif peut paraître surprenante, étant donné les dermatites de contact observées avec des fibres de carbone de structure similaire [Eedy, 1996]. Contrairement aux observations mineures réalisées suite à une application topique, les mêmes nanomatériaux ont eu des effets cytotoxiques et pro-inflammatoires sur des lignées de cellules cutanées *in vitro* (cf. § 0). La différence entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* pourrait être due à la faible pénétration des NTCs à travers la peau *in vivo*. Le fait que les implants sous-cutanés aient donné lieu à des résultats plus sévères (apparition de granulomes) [Sato *et al.*, 2005 ; Yokoyama *et al.*, 2005] semble conforter cette hypothèse.

EXPOSITION PAR D'AUTRES VOIES**Reprotoxicité**

Une étude réalisée sur des souris mâles exposées à des MWCNTs par injections intraveineuses répétées a montré que les NTCs pouvaient causer des dommages réversibles sur les testicules sans affecter la fertilité des animaux [Bai *et al.*, 2010].

Génotoxicité

Une étude réalisée sur des souris exposées par voie intrapéritonéale à des MWCNTs a mis en évidence des effets génotoxiques (augmentation significative dose-dépendante d'aberrations chromosomiques structurales, de micronoyaux et de cassures de l'ADN) dans les leucocytes circulants et / ou les cellules de la moelle osseuse [Patlolla *et al.*, 2010].

Cancérogénicité

Parmi les quatre études *in vivo* sur la cancérogénicité des NTCs présentées dans ce rapport, trois mettent en évidence le pouvoir cancérogène élevé des MWCNTs chez le rat et le rôle des NTCs dans l'apparition de mésothéliomes [Poland *et al.*, 2008 ; Takagi *et al.*, 2008 ; Sakamoto *et al.*, 2009]. Les auteurs de la quatrième étude s'interrogent sur les raisons de ces résultats négatifs. Ils évoquent plusieurs possibilités (espèces utilisées, caractéristiques physico-chimiques des NTCs, dont la taille (< 5 µm), la dose et la préparation des échantillons, la durée de l'étude ainsi que la sensibilité du test par injection intrapéritonéale) [Muller *et al.*, 2009].

3.4 Déterminants de la toxicité

Il est probable que la toxicité des NTCs dépende de leurs caractéristiques physico-chimiques.

La présence ou non de catalyseurs de synthèse pourrait être responsable de la divergence des effets observés [Donaldson *et al.*, 2006 ; Pulskamp *et al.*, 2007]. En effet, elle pourrait expliquer les résultats variables obtenus dans les études sur la capacité des NTCs à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à provoquer un stress oxydant. Dans certaines études, il a été montré une production de ROS [Manna *et al.*, 2005 ; Pulskamp *et al.*, 2007] alors que dans d'autres ce n'est pas le cas [Fenoglio *et al.*, 2006 ; Kagan *et al.*, 2006 ; Shvedova *et al.*, 2005]. Une capacité de NTCs à inhiber les espèces radicalaires a même été montrée [Fenoglio *et al.*, 2008]. Il se pourrait que ce soit la présence ou non du catalyseur métallique de synthèse qui soit à l'origine de cette différence [Pulskamp *et al.*, 2007] (*cf. étude de Pulskamp détaillée au § 3.2.1.1*).

La fonctionnalisation des NTCs semble également jouer un rôle important, les rendant parfois plus [Bottini *et al.*, 2006 ; Magrez *et al.*, 2006] ou moins toxiques [Sayes *et al.*, 2006a] ; ou encore leur état d'agglomération [Wick *et al.*, 2007] et la nature du stabilisant utilisé [Monteiro-Riviere *et al.*, 2005a], ainsi que leur dimension [Magrez *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2005].

Raffa *et al.* ont également identifié le degré de dispersion, la formation de complexes supramoléculaires et la longueur des nanotubes comme étant des paramètres cruciaux dans la détermination du mécanisme exact d'internalisation cellulaire (*dont il est question au § 3.1.1*) [Raffa *et al.*, 2010]. Il serait intéressant de savoir s'il existe un lien entre ce mécanisme et les effets des NTCs (génotoxiques, *etc.*).

Singh *et al.* ont revu les données de la littérature concernant la génotoxicité des nanoparticules et ont discuté les facteurs physico-chimiques influençant la génotoxicité. Pour ce qui concerne les NTCs, s'appuyant sur certaines études (*référéncées au § 3.2.2 et au § 3.3.1.5*), ces auteurs mentionnent la forme et la morphologie, en raison des différences d'effets entre les NTCs et le noir de carbone par exemple, et de l'impact sur l'internalisation. Ils remarquent que les NTCs ont tendance à s'enrouler, à s'associer en paquets dont les dimensions et certaines propriétés sont différentes des particules individuelles. Les propriétés de surface et la pureté sont également mentionnées, respectivement par rapport à l'existence de défauts de surface, ou à la présence de métaux susceptibles d'induire un stress oxydant via les réactions de Fenton et Haber-Weiss. La fonctionnalisation est un autre paramètre d'importance car il module les propriétés de surface [Singh *et al.*, 2009].

Synthèse relative aux déterminants de la toxicité des NTCs

Les effets biologiques et mécanismes d'action des NTCs dépendent vraisemblablement de leurs caractéristiques physico-chimiques, notamment :

- l'état d'agglomération et / ou d'agrégation (la formation de complexes supramoléculaires ou le degré de dispersion) ;
- la composition chimique (degré de pureté, présence d'impuretés, présence ou non de catalyseurs de synthèse) et la structure cristalline ;
- la taille de particules (longueur, diamètre) et distribution ;
- la forme, la cristallinité et / ou la morphologie ;
- la solubilité, la dispersabilité ;
- l'aire de surface, la surface spécifique ;
- la chimie de surface (la fonctionnalisation, la charge surfacique) ;
- la densité surfacique de charge.

Des études fondamentales complémentaires sont nécessaires pour caractériser les propriétés physico-chimiques des NTCs qui impactent leurs effets biologiques.

4 Ecotoxicité des nanotubes de carbone

A ce jour, peu d'études relevant réellement de l'écotoxicologie des nanotubes de carbone sont disponibles (voir liste des articles étudiés en Annexe 2). Parmi elles, la plupart concernent le fullerène (C₆₀). Ces études mettent en évidence l'ingestion du C₆₀ et sa toxicité associée chez plusieurs organismes modèles : crustacés d'eau douce (*Daphnia magna* et *Hyalella azteca*), copépodes marins et poissons (*Pimephales promelas*, *Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Micropterus salmoides*) [Oberdörster *et al.*, 2004 et 2006 ; Zhu S *et al.*, 2006 ; Lovern *et al.*, 2006 et 2007 ; Zhu X *et al.*, 2007 ; Usenko *et al.*, 2008].

La première étude, qui a été conduite sur le sujet montre que l'exposition pendant 48 h de la perche noire (*black-bass*) à grande bouche⁵⁴ à seulement 0,5 ppm de fullerènes colloïdaux a pour conséquence une augmentation de la peroxydation lipidique⁵⁵ dans le cerveau et une diminution du glutathion⁵⁶, qui est un marqueur du stress oxydant dans les branchies [Oberdörster *et al.*, 2004].

La présente synthèse a pour objectif de réaliser un état de l'art des connaissances disponibles concernant les effets écotoxiques des NTCs chez divers organismes. De manière générale, peu de données sont disponibles chez les micro-organismes (3 articles étudiés au § 4.1) et les végétaux (7 articles étudiés au § 4.2). La plupart des études d'écotoxicité des NTCs ont été menées sur des espèces représentatives du milieu aquatique (13 articles étudiés au § 4.3) et, dans une moindre mesure, sur des organismes terrestres (4 articles étudiés au § 4.4).

La présente synthèse se concentre essentiellement sur les NTCs multiparois -MWCNTs- mais d'autres types de NTCs (monoparois -SWCNTs- et biparois -DWCNTs-) dont la réactivité de surface est semblable bien que la morphologie soit généralement significativement différente, seront aussi mentionnés succinctement afin de compléter cet état de l'art.

4.1 Etude de l'écotoxicité des NTCs sur les micro-organismes

Trois études sur les micro-organismes ont été analysées, dont l'une sur différentes souches de bactéries gram-négatives et gram-positives et les deux autres sur des protozoaires ciliés.

4.1.1 Stimulation ou inhibition de la croissance des micro-organismes

Une étude conduite sur un protozoaire cilié, *Tetrahymena pyriformis* avec des MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) bruts ou fonctionnalisés, a mis en évidence l'importance de la fonctionnalisation⁵⁷ : les NTCs modifiés par la glucosamine stimulent la croissance du protozoaire cilié avec un effet de dose alors que dans le cas d'une fonctionnalisation par la décylamine, une inhibition de la croissance cellulaire est mise en évidence (attribuée à un effet toxique de la décylamine) [Guo *et al.*, 2008].

4.1.2 Effet cytotoxique : de la réduction de la mobilité à la mort cellulaire

La toxicité des MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) et SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) adsorbés sur des filtres a été étudiée sur différentes souches de bactéries gram-négatives et

⁵⁴ **Perche noire à grande bouche** : espèce de poisson très répandue dans les lacs et les étangs.

⁵⁵ La **peroxydation des lipides** est l'oxydation des lipides insaturés, catalysée par une enzyme peroxydase. Cette peroxydation est responsable du rancissement des aliments et *in vivo* de dommages tissulaires dus à la formation de radicaux libres lors du processus de peroxydation.

⁵⁶ Voir définition de **glutathion** en note de bas-de-page n°24 (p 21).

⁵⁷ Voir définition de **fonctionnalisation** en note de bas-de-page n°2 (p 9).

gram-positives. Les effets les plus marqués ont été observés pour les SWCNTs, qui inactivent le plus haut pourcentage de cellules dans les cultures d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis*, ainsi que dans des communautés microbiennes présentes dans les fleuves et dans les effluents d'eaux usées. Des concentrations élevées de matières organiques naturelles réduisent l'adhésion aux SWCNTs, sans malheureusement réduire les effets toxiques. Les MWCNTs ont montré en revanche une activité antibactérienne plus modérée [Kang *et al.*, 2009].

Ghafari *et al.* ont analysé l'impact des SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) sur le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila*, qui joue un rôle important dans la régulation des populations microbiennes. Ce microorganisme est également important dans le traitement des eaux usées et est un indicateur de la qualité des effluents d'eaux usées. Les SWCNTs sont internalisés, ce qui provoque l'agrégation du protozoaire et réduit sa capacité à ingérer et digérer ses proies (bactéries). Les SWCNTs ont provoqué quatre symptômes : réduction de la mobilité, agrégation cellulaire, accumulation de la matrice extracellulaire et mort cellulaire au-delà de 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Après ingestion, le microorganisme excrète les nanotubes sans signe de toxicité, mais les nanotubes interfèrent avec le processus de digestion et réduisent sa capacité à ingérer les bactéries. Comme ce type d'organisme cilié est consommé par des animaux multicellulaires, **ceci pourrait être l'une des phases initiales d'entrée des SWCNTs dans la chaîne alimentaire** [Ghafari *et al.*, 2008].

4.2 Etude de l'écotoxicité des NTCs sur les végétaux

Sept études relatives à l'écotoxicité des NTCs sur les végétaux ont été analysées, dont deux sur des cellules végétales *in vitro*, deux sur des graines (tomates et courgettes), et trois sur des plantes supérieures (radis, colza, ivraie, maïs, concombre, *etc.*).

4.2.1 Cytotoxicité

Une étude de 2009 a montré que les SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) ont la capacité de traverser la paroi des cellules des plantes. La cytotoxicité éventuelle n'a pas été établie, mais cette étude a mis en évidence **le potentiel des SWCNTs comme transporteurs des molécules dans les cellules végétales** [Liu Q. *et al.*, 2009].

Une étude *in vitro* sur les cellules d'*Arabidopsis*⁵⁸ T87 a montré que des MWCNTs (\emptyset_{moy} : 9,5 nm ; L_{moy} : 1,5 μm) sous forme d'agrégats de tailles différentes produisent des effets toxiques en fonction du \emptyset_{moy} des agrégats. Les différents agrégats sont en général toxiques, mais les échantillons de MWCNTs les moins agrégés, renfermant probablement également des nanotubes individuels, se sont montrés les plus toxiques. Ils diminuent la viabilité cellulaire, la quantité de chlorophylle, l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase⁵⁹ et la matière sèche en fin d'essai. Une hypothèse sur les effets toxiques des NTCs sur ce type de cellules envisage l'induction de signaux d'hypersensibilité par les MWCNTs. A des doses élevées ces signaux induiraient la mort cellulaire [Lin *et al.*, 2009].

4.2.2 Des résultats contradictoires sur la germination des graines et la croissance racinaire

Une étude a montré l'absence d'effet chez les plantes supérieures (radis, colza, ivraie, laitue, maïs et concombre) cultivées en présence de MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) en termes de germination des graines et de croissance racinaire [Daohui *et al.*, 2007].

⁵⁸ **Arabidopsis** est un genre de la famille des *Brassicaceae*. Ce sont de petites plantes ressemblant au chou et à la moutarde.

⁵⁹ La **superoxyde dismutase** est une métalloprotéine avec une activité enzymatique : la catalyse de la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Pour cette raison, cette enzyme est une partie importante du système de défense contre les radicaux libres. Elle est présente dans presque tous les organismes aérobies.

Khodakovskaya *et al.* ont montré que des MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) étaient capables de pénétrer les graines de tomates et d'affecter leur germination et leur vitesse de croissance. La germination était beaucoup plus élevée pour les graines cultivées dans un terrain enrichi en nanotubes par rapport au contrôle [Khodakovskaya *et al.*, 2009]. Les nanotubes pénètrent la peau épaisse des graines et améliorent l'apport en eau à l'intérieur [Wild *et al.*, 2009]. Ce processus induit une germination et une croissance accrues [Khodakovskaya *et al.*, 2009]. Le mécanisme qui conduit à l'augmentation de la quantité d'eau dans les graines n'est pas clair, mais l'effet positif des NTCs sur la germination pourrait avoir un impact économique important en agriculture et dans les secteurs liés.

Très peu d'études montrent l'impact des SWCNTs sur la croissance des plantes. Six différents types des végétaux (chou, carotte, concombre, salade, oignon et tomate) ont été cultivés en présence de SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) bruts ou modifiés avec l'acide poly-3-aminobenzène sulfonique. La croissance des racines a été affectée de manière plus importante par les nanotubes bruts. Ce type de SWCNTs inhibe l'élongation des racines chez la tomate mais l'augmente chez le concombre et l'oignon. La carotte et le chou ne sont pas affectés. L'effet n'est pas dû à une internalisation de nanotubes dans les plantes, mais aucune autre hypothèse n'est formulée [Cañas *et al.*, 2008].

Une étude similaire plus récente a concerné l'impact de MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) et d'autres nanoparticules (Ag, Cu, ZnO, Si) sur la germination de graines et l'élongation de racines du *Cucurbita pepo* (courgette). Les nanotubes étaient mis en suspension en absence ou en présence d'un tensioactif, le sodium dodécyl sulfate (SDS). La présence de SDS seul (contrôle) réduit déjà la germination, mais aucune influence additionnelle n'a été observée après l'ajout des différentes nanoparticules, exception faite des nanoparticules de silice. En absence de SDS, les MWCNTs et les autres nanoparticules n'ont pas d'impact sur la germination. L'effet phytotoxique est donc imputé au SDS. Le traitement des graines du *Cucurbita pepo* avec ces mêmes nanoparticules, avec ou sans SDS, ne modifie pas la vitesse de croissance et la longueur des racines. D'autre part, après 15 jours d'essai, **la biomasse des plantes exposées aux MWCNTs a été réduite de 60 %** par rapport aux plantes contrôles. **Ceci indique probablement que les tests de phytotoxicité, comme l'analyse de la germination et de la croissance de racines, ne sont pas suffisamment sensibles ou appropriés** [Stampoulis *et al.*, 2009].

4.3 Etude de l'écotoxicité des NTCs sur les organismes aquatiques

Treize études d'écotoxicité concernant des organismes aquatiques ont été étudiées, dont :

- une sur des algues,
- une sur un ver (l'arénicole),
- six sur des crustacés (notamment la daphnie),
- trois sur des larves d'amphibiens (*Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*),
- quatre sur des poissons (la truite) ou des embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*),

4.3.1 Pas d'effet génotoxique mis en évidence

Deux études de Mouchet *et al.* concernent les effets de DWCNTs bruts (\emptyset_{moy} : 1-3 nm et L_{moy} : 1-10 μm pour les NTCs individuels ; \emptyset_{moy} : 10-15 nm et L jusqu'à 100 μm pour les faisceaux). La première étude a été menée sur des larves de l'amphibien Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Aucun signe de toxicité ni de génotoxicité n'a été mis en évidence malgré l'ingestion massive de DWCNTs jusqu'à des valeurs extrêmes (1 000 $\mu\text{g/mL}$) [Mouchet *et al.*, 2007].

La deuxième étude a été conduite sur la Xénope (*Xenopus laevis*) chez qui, bien que des retards de croissance aient été observés aux fortes concentrations de DWCNTs (à partir de 50 $\mu\text{g/mL}$), associés à leur ingestion massive, aucune génotoxicité n'a été mise en évidence. Les effets observés semblent essentiellement liés à des perturbations d'ordre mécanique (perturbation des échanges gazeux et nutritionnels) [Mouchet *et al.*, 2008].

Plus récemment, les mêmes auteurs ont comparé l'effet écotoxique des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 10-15 nm et L_{moy} : 0,1-100 μm) et des DWCNTs (\varnothing_{moy} : 1-3 nm et L_{moy} : 1-10 μm pour les NTCs individuels ; \varnothing_{moy} : 10-15 nm et L jusqu'à 100 μm pour les faisceaux) sur des larves d'amphibien (*Xenopus laevis*). Les résultats montrent que les mécanismes de contamination des larves dépendent du type de NTC (absence de MWCNTs dans les branchies alors que les DWCNTs y sont présents), et plus particulièrement de leur morphologie et de celle de leurs agrégats. Aucun effet génotoxique n'a été mis en évidence. Une analyse par spectroscopie Raman a permis de vérifier que les NTCs ne traversent pas la barrière intestinale [Mouchet *et al.*, 2010].

4.3.2 Effets toxiques, réduction de la viabilité et augmentation de la mortalité

La toxicité des SWCNTs (\varnothing_{moy} et L_{moy} non connus) a été testée sur des algues et des crustacés sans observer des effets significatifs à des concentrations de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'absence de toxicité est principalement expliquée par la formation dans l'eau naturelle utilisée pour disperser les SWCNTs, de larges particules qui sédimentent rapidement. **Les nanotubes ne sont donc pas suffisamment dispersés en solution pour exercer leur effet écotoxique potentiel** [Velzeboer *et al.*, 2008].

En revanche, dans une étude avec des MWCNTs oxydés (\varnothing_{moy} : 10-15 nm ; L_{moy} : 0,1-10 μm) et dispersés dans une solution de Tween 20, une immobilisation de la daphnie (*Daphnia magna*) a été observée à la concentration maximale utilisée (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sans effet attribuable au Tween 20. Les embryons du *Danio rerio* exposés au même produit ont eu une mortalité entre 35 et 45 % à toutes les doses testées (3-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Toutefois, le Tween seul est responsable d'une mortalité des embryons à hauteur de 20 %. La dérégulation de l'expression des certains gènes (identifiés comme biomarqueurs des processus biologiques liés aux réponses à l'exposition aux agents toxiques) a été observée. Les auteurs de cette étude n'excluent pas un effet possible des contaminants (catalyseurs) sur la mortalité et la mobilité des deux espèces étudiées [Olasagasti *et al.*, 2009].

Templeton *et al.* ont montré chez le copépode estuarien *Amphiascus tenuiremis* une augmentation de la mortalité selon les types de SWCNTs utilisés (bruts ou purifiés) (\varnothing_{moy} et L_{moy} non connus) [Templeton *et al.*, 2006].

Kennedy *et al.* ont mis en évidence chez le cladocère *Ceriodaphnia dubia* exposé en présence de MWCNTs bruts (\varnothing_{moy} et L_{moy} non connus) une diminution de la viabilité, non observée en présence de ces mêmes MWCNTs fonctionnalisés par oxydation et donc plus hydrophiles. Ils ont observé également chez les amphipodes *Leptocheirus plumulosus* et *Hyaella azteca* exposés via le sédiment que la mortalité augmente avec la diminution de la taille des particules de sédiment, bien que cette mortalité soit plus faible dans le cas de l'exposition aux MWCNTs bruts qu'au noir de carbone et au charbon actif [Kennedy *et al.*, 2008].

Roberts *et al.* ont travaillé avec le crustacé d'eau douce *Daphnia magna* l'ingestion de SWCNTs (\varnothing_{moy} et L_{moy} non connus) recouverts de lysophospholipides et ont enregistré une mortalité associée aux fortes concentrations (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [Roberts *et al.*, 2007].

La toxicité des MWCNTs (\varnothing_{moy} : 10-20 nm ; L_{moy} : 5-15 μm), SWCNTs (\varnothing_{moy} : <2 nm ; L_{moy} : 5-15 μm) et d'autres nanoparticules sur la *Daphnia magna* a été également évaluée en termes d'immobilisation et de mortalité. L'étude a montré une toxicité aiguë avec effet de dose. La daphnie est capable d'ingérer les NTCs, avec accumulation dans l'intestin. La mortalité observée à la concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ est de 100 %. Les MWCNTs ont été trouvés plus toxiques que les SWCNTs. De plus les MWCNTs adhèrent à la surface externe des organismes. **La potentielle écotoxicité et des effets sur la santé environnementale ne doivent donc pas être négligés** [Zhu X *et al.*, 2009].

En revanche, dans une étude comparative entre les SWCNTs (\varnothing_{moy} et L_{moy} non connus) et des nanoparticules d'oxyde de titane, les nanotubes n'ont pas montré des effets évidents sur la viabilité du ver *Arenicola marina* lorsqu'ils ont été mélangés aux sédiments présents dans les estuaires où ce type d'organisme vit habituellement [Galloway *et al.*, 2010].

4.3.3 Effets reprotoxiques

Templeton *et al.* ont montré chez le copépode⁶⁰ estuarien *Amphiascus tenuiremis* une réduction du taux de fertilisation selon les types de SWCNTs utilisés (bruts ou purifiés) (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) [Templeton *et al.*, 2006].

Les effets toxiques des MWCNTs (\emptyset_{moy} : 20-40 nm ; L_{moy} : plusieurs μm) ont été étudiés sur les embryons du poisson zèbre (*Danio rerio*). Des effets tératogènes⁶¹ ont été observés au bout de 24, 48 et 72 h après fertilisation. La concentration de 40 $\mu\text{g/mL}$ est celle en deçà de laquelle aucun effet n'est observé (NOEC: *No observed effect concentration*). Aucun défaut phénotypique n'a été mis en évidence pour une concentration inférieure à 60 $\mu\text{g/mL}$. A des concentrations supérieures à 60 $\mu\text{g/mL}$ les MWCNTs étaient impliqués dans l'apoptose⁶², le retard à l'éclosion, la formation d'une corde spinale anormale, le ralentissement de la fréquence cardiaque et du flux sanguin [Asharani *et al.*, 2008].

Cheng *et al.* ont mis en évidence chez le poisson zèbre *Danio rerio* un retard à l'éclosion des œufs après exposition à des DWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) [Cheng *et al.*, 2009].

4.3.4 Effets toxicologiques respiratoires, neuronaux et hépatiques divers

Smith *et al.* ont observé chez la truite *Onchorhynchus mykiss* exposée à des SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) en présence d'un agent tensioactif, le sodium dodecyl sulfate (SDS), des effets toxicologiques respiratoires divers et des pathologies branchiales (hyperventilation, sécrétion de mucus), neuronales et hépatiques (corps apoptotiques, division cellulaire anormale). Il faut cependant nuancer ces observations du fait de la particularité des conditions d'exposition (animaux non nourris sur la durée de l'expérience) [Smith *et al.*, 2007].

4.4 Etude de l'écotoxicité des NTCs sur les organismes terrestres

Quatre études d'écotoxicité menées sur des organismes terrestres ont été analysées, dont trois concernant différentes espèces de vers de terre et la quatrième sur la drosophile.

4.4.1 Ingestion des NTCs mais pas d'absorption dans les tissus démontrée

Une étude s'est intéressée à l'absorption des MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) et des SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) chez le ver de terre *Eisenia foetida*. Les auteurs suggèrent que les NTCs détectés chez ces organismes, en quantité moindre que le contrôle pyrène, n'ont pas été absorbés dans les tissus mais sont plutôt associés aux particules de sol ingérées et présentes dans l'intestin [Petersen *et al.*, 2008a].

Petersen *et al.* ont mis en évidence chez le ver *Lumbriculus variegatus* la présence de MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) et de SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) associés aux particules de sédiment ingérées dans l'intestin, sans pour autant démontrer leur absorption dans les tissus [Petersen *et al.*, 2008b].

4.4.2 De la réduction de la mobilité à la mort cellulaire

Enfin, une étude comparative chez la drosophile *Drosophila melanogaster* de l'effet potentiel de différentes nanoparticules carbonées (C_{60} , noir de carbone, SWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) et MWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus)) n'a mis en évidence aucun effet lorsque l'exposition a lieu au stade larvaire (contamination par la nourriture), malgré une contamination évidente des organismes. En revanche, la contamination directe des adultes a montré que les différences

⁶⁰ Les **copépodes** sont un groupe de petits crustacés inférieurs.

⁶¹ **Tératogène** : se dit d'une substance pouvant provoquer un développement anormal de l'embryon et conduisant par là même à des malformations.

⁶² Voir définition d'**apoptose** en note de bas-de-page n°18 (p 17).

d'adhérence des nanoparticules (plus marquées pour le noir de carbone et les SWCNTs) pouvaient conduire à différents effets selon que le toilettage des insectes était possible ou pas. Les effets observés ont varié de la réduction de la mobilité à la mort dans les cas extrêmes [Liu X. *et al.*, 2009b].

4.4.3 Effets reprotoxiques

Une étude comparative de la toxicité du fullerène C₆₀ et des DWCNTs (\emptyset_{moy} et L_{moy} non connus) vis-à-vis du ver de terre *Eisenia veneta* (contamination via la nourriture) a montré une influence sur le taux de reproduction à partir de 37 mg DWCNT / kg de nourriture. Le taux de reproduction a été identifié comme étant le paramètre le plus pertinent (pas d'effet sur l'éclosion, la survie ou la mortalité en dessous de 495 mg de DWCNT / kg de nourriture et de 1 000 mg de C₆₀ / kg de nourriture) [Scott-Fordsmand *et al.*, 2008].

Synthèse relative à l'écotoxicité des NTCs

Micro-organismes

Les études réalisées sur les micro-organismes ont permis de mettre en évidence un effet dose-dépendant positif ou négatif (selon la fonctionnalisation) des NTCs sur la croissance d'un protozoaire [Guo *et al.*, 2008]. Elles ont également montré un effet cytotoxique des NTCs sur les micro-organismes [Kang *et al.*, 2009 ; Ghafari *et al.*, 2008] et un effet sur l'internalisation des nanoparticules chez un protozoaire, qui pourrait être l'une des phases initiales d'entrée des SWCNTs dans la chaîne alimentaire [Ghafari *et al.*, 2008].

Végétaux

Les deux études *in vitro* sur des cellules végétales ont montré des effets contradictoires.

Dans la première, la cytotoxicité éventuelle des NTCs n'a pas été établie [Liu Q. *et al.*, 2009]. Dans la seconde au contraire, ils diminuent la viabilité cellulaire, la quantité de chlorophylle, l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase⁶³ et la matière sèche en fin d'essai [Lin *et al.*, 2009]. En outre, l'étude de Liu Q. *et al.* (2009) a permis de mettre en évidence que les SWCNTs ont la capacité de traverser la paroi des cellules des plantes et peuvent transporter des molécules dans les cellules végétales.

Les cinq études concernant la germination des graines et de croissance racinaire chez des plantes supérieures exposées à des NTCs ont montré des résultats contradictoires.

Une étude n'a pas montré d'effet [Daohui *et al.*, 2007]. Deux autres ont montré que les NTCs pénétraient à l'intérieur des graines [Khodakovskaya *et al.*, 2009 ; Wild *et al.*, 2009], que la germination était beaucoup plus élevée en leur présence [Khodakovskaya *et al.*, 2009] et qu'ils amélioraient l'apport en eau à l'intérieur des graines [Wild *et al.*, 2009]. Au contraire, la quatrième étude a montré que des MWCNTs réduisaient la germination des graines de courgette [Stampoulis *et al.*, 2009]. Enfin, la dernière étude a montré que la présence des MWCNTs inhibait l'élongation des racines chez la tomate mais l'augmentait chez le concombre et l'oignon [Cañas *et al.*, 2008].

Organismes aquatiques

Parmi les treize études d'écotoxicité menées sur des organismes aquatiques, certaines ne montrent aucun effet toxique des NTCs sur des algues [Velzeboer *et al.*, 2008] ni aucun effet génotoxique sur des larves d'amphibien [Mouchet *et al.*, 2007 ; 2008 et 2010]. D'autres ont montré des effets reprotoxiques des NTCs, diminuant le taux de fertilisation chez des petits crustacés [Templeton *et al.*, 2006], entraînant des effets terratogènes ou des retards à l'éclosion chez les embryons du poisson zèbre [Asharani *et al.*, 2008 ; Cheng *et al.*, 2009] ou encore une augmentation du taux de mortalité des embryons du poisson zèbre [Olasagasti *et al.*, 2009].

Une concentration souvent rapportée (pour différents modèles et par différents auteurs) à partir de laquelle des effets sont mis en évidence est voisine de 10 µg/mL.

Organismes terrestres

Parmi les études relatives à la toxicité des NTCs chez les organismes terrestres, deux d'entre elles suggèrent que les vers de terre ingèrent des NTCs en même temps que d'autres particules de sol [Petersen *et al.*, 2008 a et b]. Une autre étude a montré des effets toxiques chez la drosophile adulte exposée à des NTCs allant de la réduction de la mobilité à la mort dans les cas extrêmes [Liu X. *et al.*, 2009b]. Enfin, une dernière étude a montré que l'ingestion de NTCs par des vers de terre pouvait faire diminuer le taux de reproduction à partir de 37 mg DWCNT / kg de nourriture [Scott-Fordsmand *et al.*, 2008].

⁶³ Voir définition de **superoxyde dismutase** en note de bas-de-page n°59 (p 51).

Discussion

Dans certaines études, les NTCs sont déposés dans les milieux d'exposition suivant une agitation magnétique ou après sonication pouvant entraîner une coupure [Heller *et al.*, 2005] ou une oxydation non contrôlée [Stathopoulos *et al.*, 2007] des NTCs. Les concentrations étudiées et durées d'exposition, ainsi que les organismes exposés sont également différents d'une expérience à l'autre.

Or, la diversité des caractéristiques (taille, forme, état de surface, fonctionnalisation, *etc.*) des nanotubes de carbone existants influence leurs effets biologiques.

De plus, les différentes espèces ne réagissent pas de la même manière aux NTCs. En effet, Blaise *et al.* ont comparé l'écotoxicité de différents types de nanoparticules dont les SWCNTs (\varnothing_{moy} : 1,2-1,5 nm ; L_{moy} : 2-5 μm , présents sous forme de faisceaux). Sur la base de tests recommandés par la Commission de l'Union Européenne, les SWCNTs ont été classifiés toxiques pour l'invertébré *Hydra attenuata* et l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* à des concentrations variant entre 1 et 10 $\mu\text{g/mL}$. Les SWCNTs sont non toxiques à des doses supérieures à 100 $\mu\text{g/mL}$ pour des bactéries, des hépatocytes primaires de truite, l'invertébré *Thamnocephalus platyurus*⁶⁴ et des systèmes phototropiques⁶⁵ [Blaise *et al.*, 2008].

La très grande diversité de modèles et de nanoparticules rend l'étude des effets écotoxicologiques des nanotubes de carbone très complexe. C'est pourquoi, il est très difficile de comparer les effets des NTCs d'une expérience à l'autre et certains résultats peuvent paraître contradictoires.

En outre, dans la plupart des études présentées ici, des effets écotoxiques ont été observés à des concentrations élevées qui ne reflètent probablement pas les conditions environnementales. Néanmoins, une incidence des NTCs sur les écosystèmes à des concentrations plus faibles ne peut pas être écartée.

Conclusion

Malgré les difficultés rencontrées, une valeur de LOEC (pour *Lowest Observed Effect Concentration*) à 10 $\mu\text{g/mL}$ a été mise en évidence chez différents organismes aquatiques [Mouchet *et al.*, 2008 ; Roberts *et al.*, 2007 ; Templeton *et al.*, 2006].

De plus, les études d'écotoxicité montrent globalement, que les NTCs peuvent être ingérés par les organismes ; à ce titre, leur dissémination et transport dans l'environnement nécessitent une vigilance accrue en termes d'évaluation du risque environnemental et de prévention.

Ainsi, les connaissances dans ce domaine ne demandent qu'à être enrichies et approfondies afin de mieux prévoir les conséquences éventuelles sur l'environnement à court ou à long terme.

⁶⁴ *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea, Anostraca) est un petit crustacé aquatique.

⁶⁵ **Phototropique** : se dit d'un organisme dont la croissance est orientée sous l'influence de la lumière, on parle de phototropisme.

5 Etude de la dispersion des nanotubes de carbone dans l'environnement

Connaître l'impact des NTCs dans l'environnement nécessite aussi de répondre à certaines interrogations concernant les quantités de NTCs éventuellement rejetées dans l'environnement, leur distribution au sein des différents compartiments (air, eau, sol), leur(s) lieu(x) d'accumulation préférentielle, leurs conditions de persistance ou de dégradation dans les différents milieux et enfin leur écotoxicité potentielle [Perez *et al.*, 2009 ; Lam *et al.*, 2006 ; Smart *et al.*, 2006 ; Oberdörster *et al.*, 2007 ; Helland *et al.*, 2007 ; AFSSET, 2006].

5.1 Quantifier les NTCs dans un milieu naturel

Les concentrations étudiées dans les différents travaux publiés sont le plus souvent élevées (jusqu'à 1 000 µg/mL [Han *et al.*, 2008] et 2 000 µg/mL [Daohui *et al.*, 2007]) en comparaison avec les concentrations de xénobiotiques présents dans l'environnement. Ces fortes concentrations pourraient correspondre à des situations de contamination aiguë et ponctuelle (en cas de déversement accidentel sur un site de production, ou encore en cours de transport par exemple). A ce jour, il est très difficile d'évaluer les concentrations de NTCs qui pourraient se trouver dans l'environnement et qui pourraient être qualifiées de réalistes d'un point de vue environnemental. Les concentrations des xénobiotiques classiques (solubles ou insolubles dans l'eau) sont plus faciles à déterminer à l'aide de techniques analytiques fiables et souvent standardisées.

Aucune méthode valable pour quantifier les NTCs dans un milieu naturel n'est disponible à ce jour.

5.2 Connaître la nature et la forme sous laquelle les NTCs seraient trouvés dans un milieu naturel

La nature et la forme sous laquelle les NTCs seraient trouvés dans les milieux naturels (air, eau, sol) restent encore inconnues : NTC bruts, NTC associés à des particules organiques et/ou inorganiques, NTC en état de dispersion, isolés ou agrégés, *etc.* Quelques études qui s'intéressent à ces problématiques sont disponibles dans la littérature. Le comportement des nanoparticules en général et des NTCs en particulier dans l'environnement implique plusieurs processus :

- i) agrégation et capacité à former des dispersions stables dans l'eau ;
- ii) effets de la forme, de la taille, de la surface spécifique et de la charge de surface sur l'agrégation (cinétique et taille) ;
- iii) adsorption à la surface extérieure des microorganismes ;
- iv) influence du changement du pH, de la force ionique (salinité), durcissement de l'eau, présence de matière organique [Perez *et al.*, 2009].

La haute hydrophobicité des NTCs et les interactions de van der Waals suggèrent des effets d'agrégation et de sédimentation dans un système aquatique. Les modifications de surface peuvent influencer le devenir des NTCs dans l'environnement : le greffage de groupements fonctionnels (covalents ou non) aide généralement ou favorise la dispersion des NTCs dans des milieux aqueux [Kennedy *et al.*, 2008]. La sédimentation perturbe profondément les phénomènes de transport des NTCs [Lin *et al.*, 2010]. Dans une étude menée en Chine, des MWCNTs bruts (\varnothing_{moy} : 20-40 nm) sous forme de particules agrégées ont très difficilement été stabilisés dans de l'eau naturelle de surface. Seulement un des huit différents types d'eaux collectées a permis d'obtenir une suspension homogène de MWCNTs, sous agitation, grâce à la présence d'un contenu total de carbone organique (dissout dans l'eau) très élevé [Lin *et al.*, 2010]. L'agrégation induit la sédimentation et par conséquent diminue le transport des nanotubes. Ceci réduit les risques d'exposition d'une part, mais augmente en contrepartie les risques de contact avec des microorganismes qui vivent sur les sédiments aquatiques. D'autre part les tensioactifs utilisés pour

dispenser les NTCs jouent un rôle dans le comportement des NTCs une fois libérés dans l'environnement. Des MWCNTs bruts (\varnothing_{moy} : 28 nm, longueur : 2 μm) stabilisés par différents tensioactifs tendent à sédimenter en présence d'argiles telles que la montmorillonite et la kaolinite, très répandues et représentant des composants importants du sol [Han *et al.*, 2008]. La précipitation des nanotubes en suspension les rend moins disponibles dans les environnements riches en argiles, en réduisant leur mobilité et donc leur transport. Une étude a montré par exemple que la cinétique d'agrégation de MWCNTs dépend de la variation en concentration des sels (monovalents – NaCl – ou bivalents – CaCl₂ ou MgCl₂), le pH et la présence de matières organiques naturelles (*i.e.* acide humique) [Saleh *et al.*, 2008]. La stabilité des suspensions de MWCNTs augmente en présence d'acides humiques. Les nanotubes sont relativement stables en conditions de pH et électrolytes typiques d'un environnement aquatique (fleuves, rivières, lacs, estuaires). Malheureusement cette étude ne peut pas être généralisée à tous les MWCNTs commerciaux.

D'autres études ont proposé des stratégies pour éliminer les nanotubes ou pour essayer de comprendre les risques qu'ils ne soient pas filtrés de manière efficace. La mobilité de MWCNTs dans des milieux poreux a été analysée. Des nanotubes modifiés et stables en suspension aqueuse (sans nécessité d'ajout de tensioactif), passent les barrières de filtration des eaux. Ces systèmes peuvent alors ne pas être adaptés à la complète élimination de MWCNTs s'ils n'incorporent pas une étape de coagulation des nanotubes [Liu X. *et al.*, 2009a]. En effet, la coagulation est un des processus les plus importants pour contrôler le devenir de nanoparticules et leur élimination dans les phases aqueuses [Holbrook *et al.*, 2010]. La coagulation peut être très efficace pour l'élimination des MWCNTs, cependant, la présence de matières organiques naturelles peut modifier l'efficacité de ce type de traitement.

6 Conclusions

Dans la plupart des études sur la toxicité ou l'écotoxicité des NTCs, les particules mises en œuvre sont peu ou pas caractérisées d'un point de vue physico-chimique. Or, l'évaluation des risques éventuels liés à la présence des NTCs dans l'environnement est intimement associée à la caractérisation physico-chimique systématique de chacun des types de NTC étudié. Les NTCs présentent des morphologies différentes (nombre de parois, diamètre, défauts de structure, catalyseurs résiduels, *etc.*) et une chimie de surface potentiellement très différente, y compris pour un même type de NTC, qu'il soit brut, dispersé ou co-exposé avec un contaminant de référence. L'un des problèmes majeurs pour l'interprétation des travaux publiés découle de la méconnaissance des échantillons étudiés et / ou de leur trop grande diversité. De même, la comparaison des résultats entre les différentes études n'est pas évidente dans la mesure où les NTCs étudiés sont tous différents.

De façon générale, l'impact des NTCs sur l'homme et l'environnement dépend de multiples facteurs. Parmi ceux-ci, il convient de mentionner leur morphologie et leur chimie de surface (fonctionnalisation de surface, *etc.*), la présence d'impuretés (traces de métaux), la dispersion, la désagglomération et les traitements post-purification qui peuvent altérer certaines propriétés (longueur, pureté, degré d'agglomération et structure par exemple). D'autres propriétés sont tout aussi importantes, entre autres, la réactivité chimique, la biopersistence et la biodisponibilité.

En ce qui concerne les effets toxiques des NTCs, ils peuvent causer du stress oxydant, de l'inflammation, des dommages à l'ADN, des dommages cellulaires (effets délétères sur la prolifération cellulaire et apoptose notamment) et des effets pathologiques à long terme (tels que la formation de granulomes, la fibrose et des mésothéliomes). Ces effets sont dépendants de la dose et du temps.

Dans la plupart des études écotoxicologiques présentées dans ce rapport, des effets ont été observés à des concentrations élevées qui ne reflètent probablement pas les conditions environnementales. Une incidence des NTCs sur les écosystèmes à des concentrations plus faibles ne peut toutefois pas être écartée. Quoi qu'il en soit, ces études montrent que les NTCs sont ingérés par les organismes ; à ce titre, leur dissémination et leur transport dans l'environnement nécessitent une vigilance accrue en termes d'évaluation du risque environnemental.

L'exposition aux nanotubes de carbone peut avoir lieu à tout moment du cycle de vie des produits en contenant (pendant leur fabrication, leur transport, leur utilisation ou leur élimination). Le plus souvent, ils sont incorporés dans des matrices et non sous forme libre à l'intérieur des produits de consommation ; il subsiste néanmoins un risque pour que des NTCs soient libérés au fur et à mesure de l'usure des produits ou lors de leur élimination. A l'heure actuelle, les études sur l'exposition des travailleurs et de la population aux NTCs font cruellement défaut. Etant donné que des produits contenant des NTCs sont d'ores-et-déjà à la portée d'un large public, des études dans ce domaine nécessitent d'être réalisées.

Ainsi, les connaissances en matière de toxicité et d'écotoxicité demandent à être enrichies et approfondies, afin de mieux prévoir les conséquences éventuelles sur l'homme et l'environnement à court et à long terme.

Enfin, il apparaît nécessaire, en parallèle du développement de la production de nanotubes de carbone, de la multiplication de leurs usages et de leur mise sur le marché, d'évaluer les expositions en conditions réelles et d'avoir une bonne connaissance du cycle de vie de ces matériaux. Sans cela, l'évaluation des risques professionnels et environnementaux reste hasardeuse.

7 Références bibliographiques

- AFSSET, 2006. Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. Synthèse. Juillet. pp 1-6.
- Al Faraj A, Cieslar K, Lacroix G, *et al.* (2009). In vivo imaging of carbon nanotube biodistribution using magnetic resonance imaging. *Nano Lett.* 2009 Mar;9(3):1023-7.
- Al Faraj A, Bessaad A, Cieslar K, *et al.* (2010). Long-term follow-up of lung biodistribution and effect of instilled SWCNTs using multiscale imaging techniques. *Nanotechnology.* 2010 Apr 30;21(17):175103.
- Asakura M, Sasaki T, Sugiyama T, *et al.* (2010). Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. *J Occup Health.* 2010 Jun 8;52(3):155-66.
- Asharani PV, Serina NGB, Nurmawati MH, *et al.* (2008). Impact of multi-walled carbon nanotubes on aquatic species. *J. Nanosci. Nanotech.* 8(7): 3603-9.
- Bai Y, Zhang Y, Zhang J, *et al.* (2010). Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nat Nanotechnol.* 2010 Sep;5(9):683-9.
- Blaise C, Gagne F, Ferard JF, *et al.* (2008). Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environ. Toxicol.* 23(5): 591-598.
- Boczkowski J. *et al.*, (2-3 décembre 2010). Déterminants physiques et chimiques des effets toxicologiques des NTC. *Journées NanoBiotechnologie, NanoToxicologie, Nano et Société*, Université d'Orsay.
- Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., *et al.* (2006). Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett*, 160(2) :121–126.
- Cañas JE, Long M, Nations S, *et al.* (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(9): 1922-31.
- Carrero-Sanchez JC, Elías AL, Mancilla R, *et al.* (2006). Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. *Nano Lett.* 2006 Aug;6(8):1609-16.
- Casey, A., Davoren, M., Herzog, E., *et al.* (2007a). Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing. *Carbon*, 45(1): 34–40.
- Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. (2007). Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Env. Toxicol Chem.* 26(4): 708-716.
- Cherukuri, P., Bachilo, S. M., Litovsky, S. H., *et al.* (2004). Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J Am Chem Soc*, 126(48):15638–15639.
- Chłopek, Czajkowska, Szaraniec., *et al.* (2005). In vitro studies of carbon nanotubes
- Crouzier D., Follot S., Gentilhomme E., *et al.* (2010). Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology*, 272, (1-3), (2010), 39-45.
- Cui, D., Tian, F., Ozkan, C. S., *et al.* (2005). Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett*, 155(1) :73–85.
- Cveticanin, Joksic, Leskovac *et al.*, (2010). Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology* 21 (2010)015102.
- Daohui Lin, Baoshan Xing (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut.* 150(2): 243-250.
- Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., *et al.* (2007). In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro*, 21(3):438–448.

- Deng X, Jia G, Wang H, *et al.* (2007). Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes *in vivo*. *Carbon* 45:1419-1424, 2007.
- Ding, L., Stilwell, J., Zhang, T., *et al.* (2005). Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett*, 5(12): 2448–2464.
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., *et al.* (2006). Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci*, 92(1) :5–22.
- Dumortier, H., Lacotte, S., Pastorin, G., *et al.* (2006). Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett*, 6(7) :1522–1528.
- Eedy DJ. (1996). Carbon-fibre-induced airborne irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1996 Dec;35(6):362-3.
- Elgrabli, Floriani, Abella-Gallart (2008). Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. *Particle and Fibre Toxicology* 2008, 5:20.
- Ellinger-Ziegelbauer, Pauluhn (2009). Pulmonary toxicity of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes®) relative to α -quartz following a single 6 h inhalation exposure of rats and a 3 months post-exposure period. *Toxicology* 266 (2009) 16–29.
- Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., *et al.* (2006). Reactivity of carbon nanotubes : free radical generation or scavenging activity ? *Free Radic Biol Med*, 40(7) :1227–1233.
- Flahaut E., Durrieu M.C., Remy-Zholgadri M., *et al.* (2006). Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon*, 44, (6), (2006), 1093-1099.
- Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, *et al.* (2009). Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ Health Perspect*. 2009 May;117(5):703-8.
- Galloway T, Lewis C, Dolciotti I, *et al.* (2010). Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environ. pollution* 158(5): 1748-55.
- Georgin D, Czarny B, Botquin M, *et al.* (2009). Preparation of (14)C-labeled multiwalled carbon nanotubes for biodistribution investigations. *J Am Chem Soc*. 2009 Oct 21;131(41):14658-9.
- Ghafari P, St-Denis CH, Power ME, *et al.* (2008). Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. *Nat. Nanotech*. 3(6): 347-351.
- Grubek-Jaworska H, Nejman P, Czuminska K, *et al.*, (2006). Preliminary results on the pathogenic effects of intratracheal exposure to one dimensional nanocarbons. *Carbon* 44 : 1057-1063.
- Guo J, Zhang X, Zhang S, *et al.* (2008). The different bio-effects of functionalized multi-walled carbon nanotubes on *Tetrahymena pyriformis*. *Curr. Nanosci*. 4(3): 240-5.
- Han Z, Zhang F, Lin D, *et al.* (2008). Clay minerals affect the stability of surfactant-facilitated carbon nanotube suspensions. *Environ. Sci. Technol*. 42(18): 6869-75.
- Helland A, Wick P, Koehler A, *et al.* (2007). Reviewing the Environmental and Human Health Knowledge Base of Carbon Nanotubes. *Env Health Persp* 115(8): 1125-1131.
- Heller DA, Barone PW, Strano MS. (2005). Sonication-induced changes in chiral distribution: a complication in the use of single-walled carbon nanotube fluorescence for determining species distribution. *Carbon* 43:651-653.
- Herzog E, Byrne HJ, Casey A, *et al.*, (2009). SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Feb 1;234(3):378-90.
- Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2 (1): 12-26.
- Holbrook RD, Kline CN, Filliben JJ. (2010). Impact of Source Water Quality on Multiwall Carbon Nanotube Coagulation. *Environ Sci. Technol*. 44(4): 1386-1391.

- Huang L., White B., Sfeir M. Y., et al. (2006). Cobalt Ultrathin Film Catalyzed Ethanol Chemical Vapor Deposition of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Phys. Chem. B*, 110 (2006) 11103-11109.
- Huczko A, Lange H. (2001a). Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Fullerene Sci Technol* 9 (2) : 247-250.
- Huczko A, Lange H, Calko E, et al. (2001b). Physiological testing of carbon nanotubes: are they asbestos-like? *Fullerene Sci Technol* 9 (2) : 251-254.
- Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, et al., (2005). Pulmonary toxicity of 1-D nanocarbon materials. *Fullerenes, nanotubes, and carbon nanostructures*, 13 : 141-145.
- Jacobsen NR, Pojana G, White P, et al. (2008). Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade mark Mouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen*. 2008 Jul;49(6):476-87.
- Jia, G., Wang, H., Yan, L., et al. (2005). Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol*, 39(5) :1378–1383.
- Kagan, V. E., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., et al. (2006). Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages : role of iron. *Toxicol Lett*, 165(1) :88–100.
- Kam NWS, Jessop TC, Wender PA, et al. (2004). Nanotube Molecular Transporters: Internalization of Carbon Nanotube–Protein Conjugates into Mammalian Cells. *J Am Chem Soc*, 126 (22): 6850–1
- Kang S, Mauter MS, Elimelech M. (2009). Microbial Cytotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Implications for River Water and Wastewater Effluent. *Environ. Sci. Technol.* 43(7): 2648-53.
- Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J. et al. (2008) Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*, 21, 1726-1732. Kennedy AJ, Hull MS, Steevens JA, et al. (2008). Factors Influencing the Partitioning and Toxicity of Nanotubes in the Aquatic Environment. *Environ Toxicol Chem.* 27(9): 1932-1941.
- Khodakovskaya M, Dervishi E, Mahmood M, et al. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano* 3(10): 3221-7.
- Kisin E.R., Murray A.R., Keane M.J., et al. (2007). Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A*, 70, 2071-2079.
- Lacerda L, et al. (2008a) Carbon nanotube shape and individualization critical for renal excretion. *Small* 4:1130–1132.
- Lacerda L, Soundararajan A, Singh R (2008b) Dynamic imaging of functionalized multiwalled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion. *Adv Mater* 20:225–230.
- Lam CW, James JT, McCluskey R et al. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* 77, 1, 126-134.
- Lam CW, James JT, McCluskey R, et al. (2006). A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol.* 36(3):189-217.
- Landois P. (2008). Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone. Thèse de doctorat en Sciences et Génie des Matériaux. Université de Toulouse, Sciences de la Matière.
- Li JG, Li W-X, Xu J-Y, et al. (2007). 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.
- Li Z, Salmen R, Huldermen T, et al. (2005). Pulmonary exposure to carbon nanotubes induces vascular toxicity. *The Toxicologist* 84 (S-1) : 213 (abstr. 1045).

- Li Z, Chapman R, Hulderman T, *et al.* (2006). Relationship between pulmonary exposure to multiple doses of single wall carbon nanotubes and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mouse model. *The Toxicologist*, 90 (1) : 213 (abstr. 1555).
- Li Z, Hulderman T, Salmen R, *et al.* (2007). Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Perspect* 115 (3) : 377-382.
- Lin C, Fugetsu B, Su Y, Watari F. (2009). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *J. Hazard Mater.* 170(2-3): 578-83.
- Lin D, Liu N, Yang K, *et al.* (2010). Different stabilities of multiwalled carbon nanotubes in fresh surface water samples. *Environ. Pollution* 158(5): 1270-4.
- Lindberg HK, Falcka G, Suhonena S, *et al.* (2009). Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Toxicology Letters*. 186 (2009) 166–173.
- Liu Q, Chen B, Wang Q, *et al.* (2009). Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Lett.* 9(3): 1007-10.
- Liu X, O'Carroll DM, Petersen EJ, *et al.* (2009a). Mobility of multiwalled carbon nanotubes in porous media. *Environ. Sci. Technol.* 43(21): 8153-8.
- Liu X, Vinson D, Abt D, *et al.* (2009b). Differential Toxicity of Carbon Nanomaterials in Drosophila: Larval Dietary Uptake Is Benign, but Adult Exposure Causes Locomotor Impairment and Mortality. *Environ. Sci. Technol.* 43(16): 6357-63.
- Lovern SB, Klaper R. (2006). *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 25(4):1132-7.
- Lovern SB, Strickler JR, Klaper R. (2007). Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C₆₀, and C₆₀H_xC₇₀H_x). *Environ Sci Technol.* 41(12): 4465-70.
- Ma-Hock, Treumann, Strauss (2009). Inhalation Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes in Rats Exposed for 3 Months. *Toxicological sciences* 112(2), 468–481 (2009).
- Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., *et al.* (2006). Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett*, 6(6) :1121–1125.
- Mangum JB, Turpin EA, Antao-Menezes A, *et al.* (2006). 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.
- Manna, S. K., Sarkar, S., Barr, J., *et al.* (2005). Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes. *Nano Lett*, 5(9) :1676–1684.
- Mercer RR, Scabilloni J, Wang L, *et al.* (2008). 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.
- Migliore L, Saracino D, Bonelli A, *et al.* (2010). Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. *Environ Mol Mutagen.* 2010 May;51(4):294-303.
- Mitchell LA, Gao J, Vander Wal R, *et al.* (2007). Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes. *Toxicol Sci* 28, 28.
- Mitchell L.A., Lauer F.T., Burchiel S.W., *et al.* (2009). Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nature Nanotechnology* 4, 451 – 456.
- Monteiro-Riviere, N. A., Inman, A. O., Wang, Y. Y., *et al.* (2005a). Surfactant effects on carbon nanotube interactions with human keratinocytes. *Nanomedicine*, 1(4) :293–299.
- Monteiro-Riviere, N. A., Nemanich, R. J., Inman, A. O., *et al.* (2005b). Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett*, 155(3) :377–384.

- Monteiro-Riviere NA, Inman AO, (2006). Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin, *Carbon* 44 : 1070-1078.
- Mouchet F, Landois P, Flahaut E, *et al.* (2007). Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNT) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Nanotoxicology*. 1(2): 149-156.
- Mouchet F, Landois P, Sarreméjean E, *et al.* (2008). Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicol.* 87(2): 127-137.
- Mouchet F, Landois P, Puech P, *et al.* (2010). Carbon nanotubes ecotoxicity in amphibians: assessment of multi-walled Carbon nanotubes and comparison with double-walled Carbon nanotubes. *Nanomedicine* (2010), 5, (6), 963-974.
- Muller J, Huaux F, Moreau N, *et al.* (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 3, 221-231.
- Muller J., Decordier I., Hoet P., *et al.* (2008a). Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 29, 427–433.
- Muller J., Huaux F., Fonseca A., *et al.* (2008b). Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: Toxicological aspects. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1698–1705.
- Muller J., Delos M, Panin N, *et al.* (2009). Absence of Carcinogenic Response to Multiwall Carbon Nanotubes in a 2-Year Bioassay in the Peritoneal Cavity of the Rat. *Toxicological Sciences*, 110(2), 442–448 (2009).
- Murr, L. and Soto, K. (2004). Tem comparison of chrysotile (asbestos) nanotubes and carbon nanotubes. *Journal of materials science*, 39(15) :4941–4947.
- Murr LE, Garza KM, Soto KF, *et al.* (2005). Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2005 Apr;2(1):31-42.
- Murray AR, Kisin E, Leonard SS, *et al.* (2009). Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology*. 2009 Mar 29;257(3):161-71.
- Oberdörster E. (2004). Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C-60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health. Perspec.* 112: 1058-1062.
- Oberdörster E, Zhu SQ, Blickley TM, *et al.* (2006). Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C-60) on aquatic organisms. *Carbon* 44: 1112-1120.
- Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. (2007). Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1(1): 2-25.
- Olasagasti M, Alvarez N, Vera C, *et al.* (2009). Evaluation of MWNTC toxic effects on daphnia and zebrafish embryos. *J. Phys: Conference Series* 170, 012018.
- Pacurari, Yin, Zhao, *et al.* (2008). Raw Single-Wall Carbon Nanotubes Induce Oxidative Stress and Activate MAPKs, AP-1, NF- κ B, and Akt in Normal and Malignant Human Mesothelial Cells. *Environmental Health Perspectives*. Vol .116, num. 9., September 2008.
- Pantarotto D, Briand JP, Prato M, *et al.* (2004). Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Comm* 16-17.
- Park, Cho, Jeong, *et al.* (2009). Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation. *Toxicology*. Volume 259, Issue 3, 17 May 2009, Pages 113-121.
- Patlolla A, Knighten B, Tchounwou P. (2010). Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. *Ethn Dis*. 2010 Winter ; 20(1 Suppl 1):S1-65-72.
- Perez S, Farre M, Barcelo D. (2009). Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* 28(6): 820-32.

- Petersen E, Huang Q, Weber W. (2008a). Bioaccumulation of Radio-Labeled Carbon nanotubes by *Eisenia foetida* *Environ. Sci. Technol.* 42 (8): 3090–3095. 10.1021/es071366f CCC.
- Petersen EJ, Huang Q, Weber WJ. (2008b). Ecological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Lumbriculus variegates*. *Environ Health Perspect.* 116(4): 496-500.
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, *et al.* (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.* 2008 Jul;3(7):423-8.
- Porter, Hubbs, Mercer (2009). Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology* 269 (2010) 136–147.
- Potapovich A, Osipov AN, Kisin ER, *et al.* (2005). Single-walled carbon nanotubes activate raw 264.7 macrophages: role in oxidative stress and inflammatory response. *Toxicologist* 84 (Suppl. 1) : 468.
- Pulskamp, K., Diabaté, S., and Krug, H. F. (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett*, 168(1) :58–74.
- Raffa V., Ciofani G, Vittorio O, *et al* (2010). Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. *Nanomedicine*, 5(1). 2010 Jan;5(1):89-97.
- Raja, P. M. V., Connolley, J., Ganesan, G. P., *et al.* (2007). Impact of carbon nanotube exposure, dosage and aggregation on smooth muscle cells. *Toxicol Lett*, 169(1) :51–63.
- Roberts AP, Mount AS, Seda B, *et al.* (2007). *In vivo* biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol.* 41(8): 3025-3029.
- Rotoli BM, Bussolati O, Bianchi MG., *et al.* (2008). Non-functionalized multi-walled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2008 May 5;178(2):95-102.
- Rotoli BM, Bussolati O, Barilli A, *et al.* (2009). Airway barrier dysfunction induced by exposure to carbon nanotubes in vitro: which role for fiber length ? *Hum Exp Toxicol.* 2009 Jun;28(6-7):361-8.
- Ruggierao A., Villa C.H., Bander E., *et al.* (2010). Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *PNAS.* July 6, 2010, vol. 107, no. 27, 12369–12374.
- Sakamoto Y., Nakae D., Fukumori N., *et al.* (2009). Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *The Journal of Toxicological Sciences.* Vol. 34 (2009), No. 1 February 65-76
- Saleh NB, Pfefferle LD, Elimelech M. (2008). Aggregation Kinetics of Multiwalled Carbon Nanotubes in Aquatic Systems: Measurements and Environmental Implications. *Environ. Sci. Technol.* 42(21): 7963-7969.
- Salvador-Morales C., Flahaut E., Sim E, *et al.* (2006). Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Molecular Immunology*, 43, (3), (2006), 193-201.
- Salvador-Morales C., Townsend P., E. Flahaut, *et al.* (2007). Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes; potential for damage to lung immune defense mechanisms. *Carbon*, 45, (2007), 607-617.
- Sargent LM, Shvedova AA, Hubbs AF, *et al.* (2009). Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. *Environ Mol Mutagen.* 2009 Oct ; 50(8):708-17.
- Sato, Y., Yokoyama, A., Ichiro Shibata, K., *et al.* (2005). 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.
- Sayes, C. M., Liang, F., Hudson, J. L., *et al.* (2006a). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. *Toxicol Lett*, 161(2):135–142.
- Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., *et al.* (2006b). Correlating nanoscale titania structure with toxicity : a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci*, 92(1):174–185.

- Scott-Fordsmand JJ, Krogh PH, Schaefer M, *et al.* (2008). The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 71(3): 616-9.
- Seaton A, Donaldson K. (2005). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *The Lancet* 365 : 923-924.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, *et al.* (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2003 Oct 24;66(20):1909-26.
- Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, *et al.* (2004). Exposure of human bronchial cells to carbon nanotubes caused oxidative stress and cytotoxicity. *In: Proceedings of the Meeting of the SFRR Europe 2003*, Ioannina, Grèce, 91-103.
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, *et al.* (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, 5, L698-708.
- Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, *et al.* (2008). 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.
- Simon-Deckers A. (2008). Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques. Thèse de doctorat en Toxicologie humaine et environnementale. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Smart SK, Cassady AI, Lu GQ, *et al.* (2006). The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*. 44(6): 1034-104.
- Smith CJ, Shaw BJ, Handy RD. (2007). Toxicity of Single Walled Carbon Nanotubes on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aqua Tox.* 82(2): 94-109.
- Soto KF, Carrasco A, Powell TG, *et al.* (2005). Comparative *in vitro* cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research* 7: 145-169.
- Stampoulis D, Sinha SK, White JC. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 43(24): 9473-9.
- Stathopoulos PB, Scholz GA, Hwang YM, *et al.* (2007). Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci.* 13:3017-3027.
- Stern ST., McNeil SE.. (2007). Review - Nanotechnology Safety Concerns Revisited. *Toxicological Sciences*. 101(1), 4–21 (2008)
- Szendi & Varga. (2008). Lack of Genotoxicity of Carbon Nanotubes in a Pilot Study. *Anticancer Research*. January-February 2008 vol. 28 no. 1A 349-352.
- Tabet L. (2009). Effet des nanotubes de carbone sur l'appareil respiratoire : Rôles de la formation d'agrégats et de la réactivité de surface. Thèse de doctorat en Toxicologie. Université de Paris 7.
- Tabet L., Bussy C., Amara N., *et al.* (2009). Adverse Effects of Industrial Multiwalled Carbon Nanotubes on Human Pulmonary Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72: 60–73, 2009.
- Takagi A, Hirose A, Nishimura T, *et al.* (2008). Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.* 2008 Feb;33(1):105-16.
- Templeton RC, Lee Ferguson P, Washburn KM, *et al.* (2006). Life-cycle effects of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNT) on an Estuarine Meiobenthic Copepod. *Environ. Sci. Technol.* 40: 7387-7393.
- Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL. (2008). Fullerene C₆₀ exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 229(1): 44–55.

- Vankoningsloo S, Piret JP, Saout C, *et al.* (2010). Cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in three skin cellular models: Effects of sonication, dispersive agents and corneous layer of reconstructed epidermis. *TNAN* 4():84-97 (2010)
- Velzeboer I, Hendriks AJ, Ragas AMJ, *et al.* (2008). Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(9): 1942-1947.
- Wang H, Wang J, Deng X; *et al.* (2004). Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice. *J Nanosci Nanotech* 4 (8) : 1019-1024.
- Wang J., Deng X., Yang S, *et al.* (2008). Rapid translocation and pharmacokinetics of hydroxylated single-walled carbon nanotubes in mice. *Nanotoxicology* - 2(1):Pages 28-32
- Wang L, Mercer RR, Rojanasakul Y, *et al.* (2010). Direct fibrogenic effects of dispersed single-walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. *J Toxicol Environ Health A.* 2010 Jan ; 73(5):410-22.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, *et al.* (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* 77, 1, 117-125.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, *et al.* (2005). Pulmonary bioassay Toxicity Study in rats with single wall carbon nanotubes. *Compte-rendu du First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials*, 12 au 14 octobre 2004, p 59-64. Buxton, Grande- Bretagne, édité par le Health and Safety Executive Grande-Bretagne et le National Institute for Occupational Safety and Health, États-Unis, juillet 2005.
- Wick, P., Manser, P., Limbach, L. K., *et al.* (2007). The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 168(2) :121–131.
- Wild E, Jones KC. (2009). Novel method for the direct visualization of *in vivo* nanomaterials and chemical interactions in plants. *Environ. Sci. Technol.* 43(14): 5290-4.
- Wirnitzer U, Herbold B, Voetz M, *et al.* (2009). Studies on the *in vitro* genotoxicity of baytubes, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicol Lett.* 2009 May 8;186(3):160-5.
- Wörle-Knirsch, J. M., Pulskamp, K., and Krug, H. F. (2006). Oops they did it again ! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett*, 6(6) :1261–1268.
- Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K *et al.* (2010). Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. *Inflammation.* 2010 Aug;33(4):276-80.
- Yang, H., C. Liu, Yang D, *et al.* (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology* 29(1): 69-78.
- Zeni O, Palumbo R, Bernini R, *et al.* (2008). Cytotoxicity Investigation on Cultured Human Blood Cells Treated with Single-Wall Carbon Nanotubes. *Sensors* 2008, 8, 488-499
- Zheng L. X., O'Connell M. J., Doorn S. K., *et al.* (2004). Ultralong single-wall carbon nanotubes. *Nature Materials*, 3 (2004) 673-676.
- Zhu S, Oberdörster E, Haasch ML. (2006). Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, *Daphnia* and *fathead minnow*. *Mar Environ Res.* 62 Suppl: S5-9.
- Zhu X, Zhu L, Li Y, *et al.* (2007). Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: buckminsterfullerene aggregates (nC₆₀) and fullerol. *Environ Toxicol Chem* 26(5): 976-9.
- Zhu X, Zhu L, Chen Y, *et al.* (2009). Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *J. Nanopart. Res.* 11(1): 67-75.

Annexe 1 : Analyse des études de génotoxicité réalisées sur les nanotubes de carbonés

	Espèce biologique	Types de NTCs	Concentrations étudiées et délai post-traitement	Effets observés ou paramètres étudiés	Référence
Etudes <i>in vitro</i>					
Cellules procaryotes (bactéries)					
SWCNT	<i>Salmonella typhimurium</i> YG1024, YG1029	SWCNTs (CNI, Inc, Houston, Tx) (HiPco) Ø : 0,4-1,2 nm ; L : 1,3 µm	Dispersion : US 30x3 cycles 0, 60, 120 et 240 µmg/boîte. Préincubation avec NTCs 37°C, 30 min.	Absence d'effet mutagène	Kisin <i>et al</i> 2007
MWCNT	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535, TA 100, TA 1537, TA 98, TA 102	MWCNTs Baytubes® Dimensions : diffraction LASER Size ≈ 50% 30-40µm (volume)	Dispersion eau déionisée (1mg/mL) US 2x5min (ou 30min ?). Traitement jusqu'à 5mg/mL avec ou sans S9. Préincubation avec NTCs 37°C, 30 min.	Absence d'effet mutagène	Wirnitzer <i>et al</i> 2009 (étude Bayer)
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100, TA 98. <i>E. coli</i> WP2uvrA	MWCNTs Sigma-Aldrich (659258) Préparation : CVD Ø : 110-170nm ; L : 5- 9 µm	Dispersion dans DMSO - 9 doses, de 0,01 à 9,0 µg/boîte ; avec ou sans S9. Incubation 72h. Préincubation avec NTCs 37°C, 20 min.	Absence d'effet mutagène	Di Sotto <i>et al</i> 2009
Cellules eucaryotes					
SWCNT	Lymphocytes humains (sang total)	SWCNTs (Sigma-Aldrich) Ø et L : non précisés	Dispersion dans DMSO, US 30 min. Zeta potentiel dans milieu de culture : non déterminé	Augmentation significative des micronoyaux, avec diminution de la prolifération (des cassures double brins (25 à 50 µg/mL).	Cveticanin <i>et al.</i> 2010
	Fibroblastes dermiques humains			Augmentation significative des cassures double brins (test γH2AX) à 25 à 50 µg/mL	

	Espèce biologique	Types de NTCs	Concentrations étudiées et délai post-traitement	Effets observés ou paramètres étudiés	Référence
	Fibroblastes pulmonaires de hamster (V79)	SWCNTs. (CNI, Inc, Houston, Tx) (HiPco) Ø : 0,4-1,2nm ; L : 1,3 µm	Dispersion : US 30x3 cycles 0, 24, 48 et 96 µg/cm ² (3 ou 24h, test comètes ; 24h, test micronoyaux)	Cassures de l'ADN (test comètes) : 3h, 96 µg/cm ² ; 24h, 4 ! et 96 µg/cm ² . Absence d'effet (micronoyaux)	Kisin <i>et al</i> 2007
	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS 2B	SWCNTs (50 % SWCNT, environ 40 % autres nanotubes) (Sigma-Aldrich) Ø: 1,1 nm ; L: 0,5-100 µm	Dispersion milieu culture, US 20 min 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 et 100 µg/cm ² (≈ 4, 19, 38, 76, 114, 228, 304, et 380) ; traitement 24,48 et 72h, post-traitement 48h	Endommagement de l'ADN (test comètes) dose-dépendant après 24h. Pas de formation de micronoyaux à 24h ou 72h (analyse altérée par le présence de NTCs), mais augmentation significative à 48h avec 10, 60 et 100 µg/cm ²	Lindberg <i>et al</i> 2009
	Cellules mésothéliales normales et malignes	SWCNTs (NIST, Gaithersburg, MD) Ø : 1,4nm ; L : 2-5 µm (fabriquant) Ø : 0,8-2,0nm ; L : 2-5 µm	Dispersion milieu, 1% SVF ; US 1min. - 25 ou 50 µg/cm ²	Augmentation significative des cassures d'ADN (comètes et H2AX) à 25 et 50 µg cm ² pour les deux types cellulaires	Pacurari <i>et al</i> 2008
	Lignée de macrophages murins, RAW 264.7	SWCNTs (CVD) (Sigma-Aldrich, N° 636797) Ø : 0,7-1,2 nm ; L : 0,5-100µm (chauffage : 200°, 10mg/mL dans solution Hank, US 2x10min)	Dispersion dans milieu de culture à partir de la suspension. Micronoyaux : 0,01-0,1-1-10-100µg/mL pendant 72h. Comètes, avec détection de l'oxydation des bases (EndoII, Fpg) : 0,01-0,1-1-10-100µg/mL 2h ou 24h.	Augmentation dose-dépendante du % de cellules avec micronoyaux, à partir de 0,10 µg/mL. Comètes : augmentation dose-dépendante à 24h, à partir de 10µg/mL ; oxydation des purines (1, 10 µg/mL), pyrimidines (100µg/mL).	Migliore <i>et al</i> 2010
	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS 2B	SWCNTs (CNI, Houston, Tx) (HiPco) Ø: 1-4 nm ; L: 0,5-1 µm (TEM)	Dispersion dans milieu de culture, US 5 min. 24, 48 et 96 µg/cm ²	Pourcentage de cellules avec anomalies de la mitose (fuseau mono, tri, multipolaire ; anomalies d'anaphase) ; fragmentation du centrosome et aneuploidie	Sargent <i>et al</i> 2009

	Espèce biologique	Types de NTCs	Concentrations étudiées et délai post-traitement	Effets observés ou paramètres étudiés	Référence
	Cellules épithéliales pulmonaires humaines primaires (donneur normal)			augmentés significativement, dès 24 µg/cm ²	
	Cellules pulmonaires humaines carcinome, A549	SWCNTs – S4 (SES Research) Ø: <2 nm, L: 5-15µm (fabriquant)	Dispersion : US 30 min dans 0,001% Triton X-100. Exposition 3h à 50µg/mL	Pas d'augmentation significative des paramètres des comètes.	Yamashita <i>et al</i> 2010
	Fibroblastes embryonnaires primaires de souris	SWCNTs (Chinese Acad Sci, Chengdu) Ø: 8 nm ; L: <5 µm	Préparation : 4h, 180°C ; dispersion SVF, US 6x30s. 5, 10 µg/mL, 24h	Augmentation significative des cassures d'ADN (test de comètes) avec les 2 concentrations. Le potentiel génotoxique des NTCs semble être principalement attribuable à la forme des particules.	Yang <i>et al</i> 2009
	Lymphocytes périphériques sanguins	SWCNTs (HeJi Inc, Hong Kong, Chine) Ø : 1,1 nm ; L : 50 µm	Préparation 0,5 mg/mL dans RPMI ; autoclave ; dispersion US Traitement : 3h. 1,5-10 µg/mL (6h).	Absence de cassures de l'ADN (test comètes)	Zeni <i>et al</i> 2008
MWCNT	Lignée dérivée de poumon de hamster chinois nouveau né (NIHS, Tokyo)	MWCNTs (MITSUI &Co) Ø: 88±5 nm, L: 5,0±4,5 µm (voir Tayaka <i>et al</i> Ind Health 48 <i>in Press</i>)	Dispersion 1 mg/mL dans (1) milieu culture + 10% SVF, (2) milieu culture + 0,5% DMSO, (3) eau + Tween 80, (4) 1% CMC. Cellules : 1,3-5-20-80 µg/mL (sonication 3 min)	Cytotoxicité : DMSO milieu > milieu > Tween 80 > CMC [+/- dans le sens inverse du diamètre : Ø DMSO milieu < milieu < CMC < Tween 80] Augmentation du % de cellules aneuploïdes ; pas d'aberrations structurales. Augmentation du % de cellules bi-multinuclées. Pas d'augmentation des micronoyaux. Pas de mutations au locus <i>hgprt</i> .	Asakura <i>et al</i> 2010

	Espèce biologique	Types de NTCs	Concentrations étudiées et délai post-traitement	Effets observés ou paramètres étudiés	Référence
	Cellules épithéliales humaines A549	MWCNTs. Sigma-Aldrich Ø: 110-170 nm (fabriquant). Ø: 100-200 nm L: quelques µm (dispersion eau, US 2x20sec)	Dispersion dans milieu de culture (1mg/mL), vortex 20 sec, US 2x20 sec. Exposition à 1, 2 ou 40 µg/cm ² (2, 40 ou 80 µg/mL), 4h.	Augmentation significative, dose-dépendante, des paramètres des comètes	Karlsson <i>et al</i> 2008
	Lymphocytes humains (sang total)	MWCNTs Ø: 20-40 nm ; L: 1-5 µm	Dispersion dans DMSO, US 30 min. Zeta potential dans milieu de culture = -14,8 mV	Augmentation significative des micronoyaux, avec diminution de la prolifération (des cassures double brins (25 à 50 µg/mL).	Cveticanin <i>et al.</i> 2010
	Fibroblastes dermiques humains			Augmentation significative des cassures double brins (test γH2AX) à 25 à 50 µg/mL	
	Lignée de macrophages murins, RAW 264.7	MWCNTs (CVD, Sigma-Aldrich, N° 659258) Ø : 110-170nm ; L : 5-9 µm (chauffage : 200°, 10mg/mL dans solution Hank, US 2x10min)	Dispersion dans milieu de culture à partir de la suspension. Micronoyaux : 0,01-0,1-1-10-100µg/mL pendant 72h. Comètes, avec détection de l'oxydation des bases (Endoll, Fpg) : 0,01-0,1-1-10-100µg/mL 2h ou 24h.	Augmentation dose-dépendante du % de cellules avec micronoyaux, à partir de 1 µg/mL. Augmentation dose-dépendante à 24h, à partir de 1 µg/mL ; oxydation des purines (1, 10 µg/mL), pyrimidines (100µg/mL).	Migliore <i>et al.</i> 2010

	Espèce biologique	Types de NTCs	Concentrations étudiées et délai post-traitement	Effets observés ou paramètres étudiés	Référence
	Cultures de cellules épithéliales pulmonaires de rat (RLE)	MWCNTs (décomposition catalytique C ₂ H ₄ sur catalyseur Co-Fe sur alumine, purif. NaOH) (selon Willemis <i>et al</i> Chem Phys Lett, 2000, 317:71-6) Ø: 20-50 nm; L: 0,7±0,07 µm	Préparation ; chauffage 200 °C, 2 h ; dispersion dans milieu de culture. 25 µg/mL – MWCNTs broyés, ou broyés et modifiés par la chaleur (600°C ou 2400°C).	Augmentation significative de la fréquence de cellules avec micronoyaux par MWCNTs broyés et modifiés par la chaleur (600°C). Augmentation non significative par les MWCNTs broyés et modifiés par la chaleur (2400°C).	Muller <i>et al.</i> 2008 Chem Res Toxicol
	Lignées cellulaires : MCF-7, RLE	MWCNTs (lab. Nuclear Magnetic Resonance, at Univ. Notre-Dame de la Paix, Namur) Ø : 11,3 nm ; L : 700 nm	Préparation ; chauffage 200 °C, 2 h ; dispersion dans milieu de culture. Exposition à 10, 20 ou 50 µg/mL Micronoyaux (MCF-7 et RLE) Aneuploidie/clastogénicité (MCF-7)	Augmentation dose-dépendante du pourcentage de cellules avec micronoyaux, pour les deux types cellulaires. Effet aneugène : Augmentation de la fréquence des cellules aneuploïdes (25 ou 50 µg/mL)	Muller, Decordier <i>et al</i> 2008 Carcinogenesis
	Fibroblastes dermiques humains (Lonza Inc, Rockland ME)	MWCNTs (CVD) (NanoLab Inc. ; Newton MA) Ø: 15-30 nm, L: 15-20µm (fabriquant) Ø: 15nm ; L : up to 12µm (TEM, US 60 min)	Préparation : chauffage sous argon 2000°C. Fonctionnalisation H ₂ SO ₄ /HNO ₃ (2-7% COOH en surface, pondéral) Dispersion sérum physiologique + Tween 80 ; US 60 min. 40, 200 et 400µg/mL 48h	Augmentation significative, dose dépendante, des paramètres des comètes.	Patlolla <i>et al</i> 2010
	Lymphocytes humains	MWCNTs (Shenzhen Nanotech. Port Co. Ltd. Chine) Ø : 10-30 nm ; L : 1-2 µm	Dispersion dans gel semi liquide à base de carbopol et agitation magnétique*. Traitement : 1mg/mL	Pas d'augmentation significative du pourcentage de cellules altérées (tests : micronoyaux et ECs)	Szendi et Varga 2008

	Espèce biologique	Types de NTCs	Concentrations étudiées et délai post-traitement	Effets observés ou paramètres étudiés	Référence
	Fibroblastes pulmonaires de hamster chinois V79	MWCNTs Baytubes® Dimensions diffraction LASER Size ≈ 50% 80-90µm (volume) ; jusqu'à 50 µm après 4h d'incubation	Dispersion eau déionisée (1mg/mL) US 2x5min (ou 30min ?). Traitement 2,5-5-10µg/mL, 4h et 18h ; post traitement 18h et 30h avec 10µg/mL, avec ou sans S9	Absence d'effet clastogène (test d'aberrations chromosomiques)	Wirnitzer <i>et al</i> 2009 (étude Bayer)
	Cellules pulmonaires humaines carcinome, A549	MWCNTs - M1 (Meijo nano carbon) Ø: 20-60 nm, L: 5-15 µm (fabriquant)	Dispersion : US 30 min dans 0,001% Triton X-100. Exposition 3h à 50µg/mL	Cassures ADN : Augmentation significative des paramètres des comètes.	Yamashita <i>et al</i> 2010
MWCNTs – M2 (SES Research) Ø: 60-100 nm, L: 1-2µm (fabriquant)		Dispersion : US 30 min dans 0,001% Triton X-100. Exposition 3h à 50µg/mL	Pas d'augmentation significative des paramètres des comètes		
MWCNTs – M3 (SES Research) Ø: <10nm, L: 1-2 µm (fabriquant)		Dispersion : US 30 min dans 0,001% Triton X-100. Exposition 3h à 50µg/mL	Pas d'augmentation significative des paramètres des comètes		
	Cellules souches embryonnaires (ES) (<i>Aprt</i> ^{+/+}) de souris	MWCNTs (Tsinghua & Nananfeng, Chine)	Purification : agitation dans HCl 37%, 80°, 12h ; filtration, lavages eau, séchage sous vide. Stérilisation UV. Dispersion par sonication. Traitement : 0, 5 et 100 µg/mL, 2h et 4h.	Endommagement de l'ADN : Induction d'enzymes de réparation de l'ADN (OGG1, Rad51), phosphorylation de H2AX. Mutations du gène <i>Aprt</i> (adenine phosphoribosyl transferase) (5 µg/mL)	Zhu <i>et al</i> 2007
Etudes <i>in vivo</i>					
Exposition par voie respiratoire					
MWCNT	Rats wistar	MWCNTs (lab. Nuclear Magnetic Resonance, at Univ. Notre-Dame de la Paix, Namur) Ø : 11,3 nm ; L : 700 nm	Dispersion dans sérum physiol., 1% Tween 80 – 0,5 et 2mg/rat – réponse court terme : 3 jours. Administration intra-trachéale. Isolement des pneumocytes de	Augmentation significative du pourcentage de cellules avec micronoyaux à 2 mg/rat.	Muller <i>et al</i> 2008 Carcinogenesis

	Espèce biologique	Types de NTCs	Concentrations étudiées et délai post-traitement	Effets observés ou paramètres étudiés	Référence
			type II isolés puis 2 jours de culture.		
SWCNT	Souris C57BL/6	SWCNTs (CNI, Houston, Tx) (HiPco). Analyse : métaux L : 100-1,000µm (fabriquant) Ø: 240nm (count mode a.e.d)	Inhalation 4 jours : 5mg/m ³ Aspiration pharyngée : 10µg/souris (SVF, 3x30sec) Réponses à court terme (1,7, 28 jours)	Mutations du gène Kras dans le poumon (inhalation) – Pas de mutation (aspiration pharyngée)	Shvedova <i>et al</i> 2008
Exposition par voie orale					
SWCNT	Rats femelles Fisher 344	SWCNTs (Thomas Swan and Co Ltd, Consett, UK) 0,9-1,7 nm L < 1 µm (fabriquant)	Gavage, suspension dans sérum physiologique (SP) ou huile blé 0,064 et 0,64 mg/kg dans 200µl. Délai = 24h.	Augmentation de l'oxydation de la deoxyguanine (8-oxodG) dans le foie et le poumon, aux 2 doses. Pas d'oxydation dans les épithéliales cellulaires de colon (obtenues par grattage). L'huile seule augmente la quantité de 8-oxodG par rapport au sérum physiologique.	Folkmann <i>et al</i> 2009
MWCNT	Rats Fischer 344	SWCNTs (Shenzhen Nanotech. Port Co. Ltd. Chine) Ø : < 2 nm ; L : 4-15 µm MWCNTs (Shenzhen Nanotech. Port Co. Ltd. Chine) Ø : 10-30 nm ; L : 1-2 µm	Dispersion dans gel semi liquide à base de carbopol et agitation magnétique*. Exposition : gavage, 5mg/kg. Urines collectées après 24h ; extraction acétone diéthyl éther/méthanol.	Absence de mutagénicité des urines (Test de mutagenèse sur Salmonella tyhimurium, TA 98 et TA 100, avec et sans mix enzymes de détoxification . β-glucuronidase). Absence de mutagénicité des urines (Test de mutagenèse sur Salmonella tyhimurium, TA 98 et TA 100, avec et sans mix enzymes de détoxification . β-glucuronidase).	Szendi et Varga 2008

	Espèce biologique	Types de NTCs	Concentrations étudiées et délai post-traitement	Effets observés ou paramètres étudiés	Référence
Exposition par d'autres voies					
MWCNT	Souris Swiss-Webster	MWCNTs (NanoLab, Newton, MA) (CVD) Ø : 15-30 nm ; L : 15-20 µm.	Traitement : chauffage argon, 2000°C ; H ₂ SO ₄ /HNO ₃ (8:1) => 2-7% COOH. TEM Lab : 1% tween 80 dans serum physiol., US 60min ; ; L ≤ 12µm, Ø : 11,5µm après fonctionnalisation. Dispersion : NaCl 0,9%, 1% Tween 80 ; US, 4°C, 1 sec on/1 sec off pendant 30 min. Ø hydrodynamique ≈ 1µm Injection intraperitonéale (fonctionnalisés et non fonctionnalisés) : 9,25-0,5-0,75 mg/kg par jour pendant 5 jours.	Sur cellules moelle osseuse ; aberrations chromosomiques (CAs), micronoyaux (Mns) et cassures ADN (test comètes). Délai post-traitement : 24 h. Augmentation significative dose-dépendante des CAs structurales, Mns et cassures ADN. Effet MWCNTs fonctionnalisés > non fonctionnalisés pour Mns et comètes).	Patlolla, Hussain <i>et al.</i> 2010

* selon Szendi et Varga. Egészségtudomány, 50 :73-82, 2006. Article en hongrois.

Annexe 2 : Etudes réalisées sur les nanotubes de carbones dans le domaine de l'écotoxicologie

	Espèce biologique	Types de NTCs et mode d'exposition	Concentrations étudiées	Effets observés ou paramètres mesurés	Référence
Bactéries	Protozoaire cilié <i>Tetrahymena pyriformis</i>	MWCNT bruts MWCNT modifiés avec glucosamine ou décylamine	xx µg/mL Article non accessible	Pas d'effets toxiques observés avec les MWCNT bruts ou modifiés avec la glucosamine. Stimulation de la croissance dose-dépendante avec les MWCNT modifiés avec la glucosamine. Inhibition de la croissance avec les MWCNT modifiés avec la décylamine, attribuée à un effet toxique de la décylamine.	Guo <i>et al.</i> , 2008
	Bactéries	SWCNT	100 µg/mL	Pas d'effets toxiques observés	Velzeboer <i>et al.</i> , 2008 ; Blaise <i>et al.</i> , 2008
	Protozoaire cilié <i>Tetrahymena thermophila</i>	SWCNT	> 7 µg/ml	L'internalisation de SWCNT provoque : mobilité diminuée, agrégation cellulaire, accumulation de la matrice et morte cellulaire. Après ingestion, l'organisme excrète les nanotubes sans signe de toxicité, mais ces derniers interfèrent avec le processus de digestion et réduisent la capacité à ingérer les bactéries	Ghafari <i>et al.</i> , 2008
	Bactéries <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> Communautés microbiennes de fleuves et d'effluents d'eaux usées	MWCNT SWCNT	Adsorbés sur des filtres	Inactivation de cellules par les SWCNTs Activité antibactérienne plus modérée par les MWCNTs	Kang <i>et al.</i> , 2009
Plantes	Radis <i>Raphanus sativu</i> , colza <i>Brassica napus</i> , ivraie <i>Lolium perenne</i> , laitue <i>Lactuca sativa</i> , concombre <i>Cucumis sativus</i> , maïs <i>Zea may</i>	MWCNT	20, 200, 2000 µg/mL	Germination des graines et croissance racinaire non affectées	Daohui <i>et al.</i> , 2007
	Systèmes phototropiques	SWCNT	>100 µg/mL	Pas d'effets toxiques observés	Blaise <i>et al.</i> , 2008

Espèce biologique	Types de NTCs et mode d'exposition	Concentrations étudiées	Effets observés ou paramètres mesurés	Référence
<i>Cucurbita pepo</i> (zucchini)	MWCNT en absence ou en présence de SDS	1000 µg/mL	Germination des graines et croissance racinaire non affectées en absence de SDS. Effet phytotoxique imputé au SDS. Biomasse de plantes réduite du 60% par rapport aux contrôles.	Stampoulis <i>et al.</i> , 2009
<i>Arabidopsis</i> T87	MWCNT	10, 60, 100, 600 µg/mL	MWCNT sous forme d'agrégats de taille différente, toxiques en fonction du diamètre des agrégats. MWCNT moins agrégés, renfermant également des nanotubes individuels, plus toxiques. Diminution de la viabilité cellulaire, du contenu de chlorophylle, de l'activité de l'enzyme superoxide dismutase et du poids sec en fin d'essai.	Lin <i>et al.</i> , 2009
Tomate	MWCNT	10, 20, 40 µg/mL	Germination des graines et vitesse de croissance racinaire augmentées. Augmentation de l'apport d'eau dans les graines.	Khodakovskaya <i>et al.</i> , 2009
Chou, carotte, concombre, laitue, oignon, tomate	SWCNT et SWCNT modifiés avec acide poly-3-aminobenzène sulfonique	xx µg/mL Article non accessible	Croissance racinaire : Tomate : inhibée par les SWCNTs Concombre et oignon : augmentée par les SWCNTs Laitue : inhibée par les SWCNTs modifiés Carotte et chou : non affectée par les SWCNTs et les SWCNTs modifiés	Cañas <i>et al.</i> , 2008
Algues	SWCNT	100 µg/mL	Pas d'effets toxiques observés	Velzeboer <i>et al.</i> , 2008
Algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	SWCNT	1 –10 µg/mL	Toxiques. Inhibition de la croissance	Blaise <i>et al.</i> , 2008

	Espèce biologique	Types de NTCs et mode d'exposition	Concentrations étudiées	Effets observés ou paramètres mesurés	Référence
Organismes aquatiques (vers, crustacés, poissons)	Daphnie <i>Daphnia magna</i>	SWCNT en présence de lysophosphatidylcholine	2.5 – 5 – 10 et 20 µg/mL	Ingestion de SWCNT recouverts de lysophospholipide. Les daphnies sont capables de modifier les NTCs en éliminant les lysophospholipides de couverture. 100% de mortalité après 48 h à 20 µg/mL. 85% de mortalité après 96 h à 20 µg/mL.	Roberts <i>et al.</i> , 2007
	Daphnie <i>Daphnia magna</i>	MWCNT oxydés	3 – 16 µg/mL	Immobilisation à la conc. maximale utilisée	Olasagasti <i>et al.</i> , 2009
	Daphnie <i>Daphnia magna</i>	MWCNT SWCNT	0.1 – 100 µg/mL	100% de mortalité à 100 µg/mL. EC50 et LC50 mesurées respectivement pour l'immobilisation et la mortalité. EC50 8.723 µg/mL et LC50 22.7 µg/mL pour les MWCNTs EC50 1.306 µg/mL et LC50 2.4 µg/mL pour les SWCNTs	Zhu <i>et al.</i> , 2009
	Amphipodes (sédiment) <i>Hyalella azteca</i> , <i>Leptocheirus plumulosus</i> , ----- Cladocères (colonne d'eau) <i>Ceriodaphnia dubia</i>	MWCNT bruts MWCNT-OH MWCNT-COOH Stabilisés en présence de matière organique ----- MWCNT bruts MWCNT-OH MWCNT-COOH Stabilisés en présence de matière organique	0.4 – 1.1 – 3.3 – 9.9 – et 30 % de chaque type de MWCNT dans le sédiment (poids sec w/w) pour <i>H. azteca</i> et <i>L. plumulosus</i> ----- 32 et 120.2 µg/mL de MWCNT-OH, 39.5 µg/mL de MWCNT bruts et 88.9 µg/mL de MWCNT-COOH pour <i>C. dubia</i>	Ingestion de MWCNT bruts, hydroxylés et carboxylés pouvant entraîner mortalité et immobilisation <i>C. dubia</i> EC50 à 48 h = 50.9 µg/mL MWCNT bruts	Kennedy <i>et al.</i> , 2008
	Copépode estuarien <i>Amphiascus tenuiremi</i>	SWCNT	0,58 – 0,97 – 1,6 et 10 µg/mL	Augmentation de la mortalité. Réduction du taux de fertilisation selon les mélanges de NTC utilisés. Réduction du succès de développement des nauplius.	Templeton <i>et al.</i> , 2006
	<i>Hydra attenuata</i>	SWCNT	1 –10 µg/mL	Toxiques. Changements morphologiques observés.	Blaise <i>et al.</i> , 2008
	<i>Thamno platyurus</i>	SWCNT	100 µg/mL	Pas d'effets toxiques observés	Blaise <i>et al.</i> , 2008

Espèce biologique	Types de NTCs et mode d'exposition	Concentrations étudiées	Effets observés ou paramètres mesurés	Référence
Ver <i>Arenicola marina</i>	SWCNT	0.03 mg/g	Pas d'effets toxiques observés	Galloway <i>et al.</i> , 2010
Annélide oligochète d'eau douce <i>Lumbriculus variegatus</i>	C ¹⁴ -MWCNT C ¹⁴ -SWCNT	0.37 et 0.037 mg/g (pour MWCNT) 0.03 et 0.003 mg/g de sédiment sec (pour SWCNT)	Facteur de bioaccumulation plus faible que le contrôle (pyrène). Les NTCs sont présents dans l'intestin, associés aux particules de sédiment ingérées. Il n'est pas démontré d'absorption des NTCs par les tissus.	Petersen <i>et al.</i> , 2008b
Crustacés	SWCNT	100 µg/mL	Pas d'effets toxiques observés	Velzeboer <i>et al.</i> , 2008
Embryons du poisson zèbre <i>Danio rerio</i>	MWCNT	2.5 – 300 µg/mL	Effets tératogènes à conc. >40 µg/mL Défauts phénotypiques à conc. >60 µg/mL Apoptose, éclosion retardée, formation d'une corde spinale anormale, réduction de la vitesse du cœur et un ralentissement du flux sanguin à conc. >60 µg/mL	Asharani <i>et al.</i> , 2008 ; Olasagasti <i>et al.</i> , 2009
	MWCNT oxydés	3 – 16 µg/mL	Mortalité entre 35 et 45%	
Amphibien Axolotl <i>Ambystoma mexicanum</i>	DWCNT bruts	1 – 10 – 100 – 125 – 250 – 500 et 1000 µg/mL	Aucun signe de toxicité aiguë (mortalité, croissance) ni de génotoxicité (induction de micronoyau) n'a été mis en évidence malgré l'ingestion massive des NTCs par les larves.	Mouchet <i>et al.</i> , 2007
Amphibien Xénope <i>Xenopus laevis</i>	DWCNT bruts	10 – 100 – 500 µg/mL	Mortalité et retard de croissance ont été mesurés aux fortes concentrations de DWNT, associés à l'ingestion massive de DWNT. Pas de génotoxicité associée (induction de micronoyaux).	Mouchet <i>et al.</i> , 2008
Amphibien Xénope <i>Xenopus laevis</i>	MWCNT DWCNT	0.1 – 50 µg/mL	Retards de croissance à partir de 10 µg/mL pour les DWCNT et 50 µg/mL pour les MWCNT (attention, le nombre de NTC est plus important pour une masse de donnée de DWCNT que pour la même masse de MWCNTs). Absence de génotoxicité.	Mouchet <i>et al.</i> , 2010
Poisson zèbre <i>Danio rerio</i>	DWCNT bruts SWCNT bruts	20 – 60 – 120 – 240 et 360 µg/mL	Retard à l'éclosion des œufs à partir de 120 µg/mL (SWCNT) et 240 µg/mL (DWCNT)	Cheng <i>et al.</i> , 2007
Truite <i>Onchorhynchus mykiss</i>	SWCNT en présence de SDS	0.1 – 0.5 et 0.25 µg/mL	Effets toxicologiques respiratoires, pathologies branchiales et neuronales, atteintes hépatiques via la formation de corps apoptotiques, division cellulaire anormale, élévation du taux de ventilation et sécrétion de mucus, augmentation de l'activité Na ⁺ -ATPase dans les branchies et l'intestin, diminution de l'acide thiobarbiturique dans le cerveau, les branchies et le foie, augmentation du niveau total de glutathion dans les branchies et	Smith <i>et al.</i> , 2007

	Espèce biologique	Types de NTCs et mode d'exposition	Concentrations étudiées	Effets observés ou paramètres mesurés	Référence
				le foie.	
Organismes terrestres	Annélide oligochète terrestre <i>Eisenia foetida</i>	C ¹⁴ -MWCNT C ¹⁴ -SWCNT	0.03 mg/g de sol sec 0.3 ou 0.03 mg/g de sol sec	Facteur de bioaccumulation 2 fois plus faible que le contrôle (pyrène). Les NTCs sont présents dans l'intestin, associés aux particules de sol ingérées. Il n'est pas démontré d'absorption des NTCs par les tissus.	Petersen <i>et al.</i> , 2008a
	Ver de terre <i>Eisenia veneta</i>	DWCNT			Scott-Fordsmand <i>et al.</i> , 2008
	<i>Drosophila Melanogaster</i>	MWCNT SWCNT			Liu X <i>et al.</i> , 2009



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr