



HAL
open science

Toxicité et clairance pulmonaires des nanotubes de carbone

Dan Elgrabli

► **To cite this version:**

Dan Elgrabli. Toxicité et clairance pulmonaires des nanotubes de carbone. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2008. Français. NNT : . tel-00347713

HAL Id: tel-00347713

<https://theses.hal.science/tel-00347713v1>

Submitted on 16 Dec 2008

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

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

UNIVERSITE PARIS 7- DENIS DIDEROT

Ecole doctorale ABIES

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7

Spécialité : Toxicologie

Présentée par

Dan ELGRABLI

**Toxicité et clairance pulmonaires des
nanotubes de carbone**

Soutenue le 1 décembre 2008

Jury

Pr Francelyne Marano
Pr Elias Fattal
Pr Dominique Lison
Dr Jorge Boczkowski
Dr Ghislaine Lacroix
Dr Daniel Bernard

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Invité

UNIVERSITE PARIS 7- DENIS DIDEROT

Ecole doctorale ABIES

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7

Spécialité : Toxicologie

Présentée par

Dan ELGRABLI

**Toxicité et clairance pulmonaires des
nanotubes de carbone**

Soutenue le 1 décembre 2008

Jury

Pr Francelyne Marano
Pr Elias Fattal
Pr Dominique Lison
Dr Jorge Boczkowski
Dr Ghislaine Lacroix
Dr Daniel Bernard

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Invité

Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu le Dr Ghislaine Lacroix et le Dr Jorge Boczkowski qui ont dirigé cette thèse. Tout au long de ces trois années, ils ont su m'orienter dans mes recherches, tout en me faisant confiance et en me donnant les moyens d'y parvenir. Ils ont toujours été disponibles lorsque j'en avais le plus besoin. Pour tout cela, je les remercie vivement.

Je remercie Madame la présidente Francelyne Marano et les rapporteurs de cette thèse le Pr Elias Fattal et le Pr Dominique Lison pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et le temps qu'ils y ont consacré en dépit de leur emploi du temps très chargé. Merci également au Dr Daniel Bernard de la société Arkema qui a accepté de juger ce travail.

Je souhaite remercier le Dr René de Sèze pour m'avoir accueilli au sein de son unité durant ces trois années mais aussi le Dr Olivier Aguerre-Chariol, Laurent Meunier, Patrice Delalain et Karine Moirez qui ont joué un rôle fondamental dans ma formation pour tous les aspects relatifs à la granulométrie, la microscopie électronique et la chimie minérale et sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

La qualité et la réalisation des expériences présentées ici sont aussi le fruit d'un travail d'équipe. J'ai pour cela pleinement apprécié de la présence et de l'efficacité des techniciens de l'équipe. Mes plus vifs remerciements à Christelle Gamez, Franck Robidel, Anthony Lecomte, Olivier Dupont, Agnes Gaudillot et Franck Gondelle, pour leur aide et leur disponibilité.

J'ai eu également le plaisir de collaborer avec d'autres laboratoires. Je pense en premier lieu à Magali Floriani (IRSN, Cadarache) sans qui les coupes de tissus en microscopie électronique ainsi que leurs analyses EDX n'auraient pu être réalisées. Merci également à Valérie Demais (IFR 37, Strasbourg) pour s'être libérée dans l'urgence lorsque notre microscope est tombé en panne.

Merci à Frédéric Bois et Enrico Mombelli pour les remarques et les corrections de mes publications et notamment pour l'amélioration de mon anglais. J'ai également une pensée pour toutes les personnes avec qui j'ai partagé un peu de temps, un café ou un repas pendant ces trois années et notamment Oussama, Mohamed, Françoise, Audrey, Anne-Sophie, Xiaolin, Sophie, Steve, Mélanie, Anne, Frédéric, Xavier, Bernadette, Cynthia, Delphine...

Enfin, je souhaiterais remercier mes parents, mom épouse, ma sœur et mon frère qui au cours de ces trois années m'ont soutenu, encouragé et sans qui je ne serais certainement pas arrivé ici aujourd'hui.

SOMMAIRE

1. Introduction	1
1.1. Définitions et généralités	1
1.2. Les nanoparticules dans la société	2
1.3. Contexte et objectifs de l'étude	3
2. Les nanotubes de carbone : quelques généralités.	5
2.1. Qu'est ce qu'un nanotube de carbone ?	5
2.2. Comment produire un nanotube de carbone ?	6
2.2.1 Décharge électrique	6
2.2.2 Vaporisation laser	7
2.2.3 Dépôt en phase vapeur (CVD)	8
2.3. Propriétés et applications des nanotubes de carbone	8
2.3.1 Propriétés électriques	8
2.3.2 Propriétés mécaniques	9
2.3.3 Propriétés chimiques	9
2.3.4 Autres propriétés	9
2.3.5 Applications	9
3. Toxicité des nanotubes de carbone	11
3.1 Les déterminants physiques influençant la toxicité des nanotubes de carbone	11
3.1.1. La surface spécifique	11
3.1.2. L'état d'agglomération des nanotubes de carbone	12
3.1.3. Les cofacteurs métalliques	12
3.1.4. La longueur des nanotubes de carbone	12
3.2 Toxicité des nanotubes de carbone suite à un contact cutané	13
3.3 Toxicité des nanotubes de carbone suite à une ingestion ou une injection intraveineuse	16
3.4 Toxicité des nanotubes de carbone suite à sa pénétration via la voie respiratoire	17
3.4.1 Structure et types cellulaires de l'appareil respiratoire	17
3.4.2 Dépôt des nanoparticules dans l'appareil respiratoire : Impact des propriétés physico-chimique sur la toxicité pulmonaire.	19
3.4.3 Toxicité pulmonaire des nanotubes de carbone	22
3.4.3.1 Altérations histopathologiques, stress oxydant et inflammation	22
3.4.3.2 Effets cancérogènes des nanotubes de carbone	29
3.4.3.3 Comparaison de la toxicité des nanotubes de carbone et de l'amiant	30
4. Résultats et discussion	32
4.1. Effet de la BSA sur la dispersion des nanotubes de carbone pour les études <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	33
4.1.1. Introduction à l'article :	33
4.1.2. Article 1	34
4.1.3. Résumé de l'article	48
4.2. Induction de l'apoptose et absence d'effets proinflammatoires dans le poumon de rat suite à une exposition de nanotubes de carbone multi-feuillets par instillation intratrachéale.	51
4.2.1. Introduction à l'article	51
4.2.2. Article 2	52
4.2.3. Résumé de l'article	59

4.3. Biodistribution et clairance de nanotubes de carbone instillés dans les poumons de rats..	61
4.3.1. Introduction à l'article	61
4.3.2. Article 3	62
4.3.3. Résumé de l'article	90
5. Bilan et Conclusion générale	93
5.1 La démarche méthodologique	93
5.2 La toxicité des nanotubes de carbone	94
5.3 Perspectives	96
6. Références	98

Liste des abréviations

AHA-SWCNT : SWCNT fonctionnalisés par de l'acide 6-aminohexanoïque

ARNm : Acide ribonucléique messenger

EDX : Methode d'analyse de la nature d'atomes par émission de photons X

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HEK : Human epidermal keratinocytes

IL- : Interleukine

IT : Instillation intratrachéale

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

MET : Microscope électronique à transmission

MWCNT : Nanotube de carbone multi-feuillets (multi walled carbon nanotube en anglais)

nm : nanomètre(s)

NP : Nanoparticule(s)

NTC : Nanotube(s) de Carbone

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

PUF : Particule(s) Ultra Fine(s)

ROS : Espèces activées de l'oxygène

SWCNT : Nanotube de carbone simple feuillet (single walled carbon nanotube en anglais)

Résumé

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

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

Abstract

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

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

1. Introduction

1.1. Définitions et généralités

Il n'existe pas de définition internationale commune de ce qu'est une nanoparticule, mais un extrait du document PAS71 développé au Royaume-Uni mentionne qu'« une nanoparticule est un corps ayant une dimension de l'ordre de 100nm ou moins » (UK Department of Trade and Industry et British Standards Institution, 2005). Cependant d'autres sources définissent les nanoparticules (NP) comme étant constituées d'atomes, de molécules qui comportent deux ou trois dimensions pouvant mesurer entre 1 et 100 nanomètres (Office québécois de la langue française, 2008). Au sein de cette famille, il est important de distinguer les particules ultra fines (PUF) d'origine naturelle ou anthropique dans l'environnement et les nanomatériaux manufacturés issus des nanotechnologies. Les nanotechnologies peuvent être définies comme l'ensemble des études des procédés de fabrication et de manipulation de structures, de dispositifs et de systèmes matériels à l'échelle du nanomètre (nm). Il existe une grande diversité de NP variant de par leur taille, leur forme, leur nature chimique et leurs propriétés physiques. La faible taille des NP leur confère des propriétés physico-chimiques particulières répondant aux lois de la mécanique quantique qui diffèrent de celles observées sur ces mêmes particules à plus grande échelle. Lors de ces travaux, nous appellerons nanoparticules, les particules manufacturées produites par les nanotechnologies en opposition aux PUF d'origine naturelle et/ou anthropique se retrouvant mélangées dans l'atmosphère de façon non intentionnelle. Parmi les NP, on distingue un grand nombre de familles dont les nano objets, les métaux, les semi-conducteurs, les oxydes métalliques, les polymères composites, les céramiques, les nanosphères, les fils, les aiguilles, les tubes, les molécules (fullerènes) simples et complexes, les agrégats moléculaires ou atomiques non traités ou enrobés (Comité français de la prévention et de la précaution, 2006). Toutes ces particules, associées à leurs propriétés

particulières, vont permettre d'envisager le développement d'un grand nombre de nouveaux produits.

1.2. Les nanoparticules dans la société

Les propriétés particulières des NP expliquent l'engouement accru, ces dernières années, au niveau mondial. Nous avons pu observer un investissement de plus en plus grand de la part de nombreux pays. Les financements gouvernementaux alloués à la nano-recherche sont ainsi passés d'un peu moins de 500 millions de dollars en 1997 à plus de 3,5 milliards de dollars en 2004 (Service., 2004). Si ces particules suscitent une telle attention, c'est en particulier parce que leur utilisation est envisagée dans divers secteurs industriels tels que l'électronique, l'aéronautique, la cosmétique, la recherche ou encore la médecine... A l'heure actuelle sur le marché européen, plus de 35 applications utilisent des NP (Nanotechnologies-project, 2007). Il s'agit de textiles insalissables recouverts d'une pellicule de nanoparticules d'argent, de verres autonettoyants sur lesquels ont été déposées des couches minces d'oxyde de titane, de nanofilms couvrant les cabines de douche, des éviers, des carrosseries, de dentifrices au nanophosphate de calcium qui comblent les minuscules fissures des dents, de produits anti-solaires au dioxyde de titane, rouges à lèvres à l'oxyde de zinc pour améliorer la tenue, vernis à ongles enrichis en oxyde de zirconium... Cependant, l'utilisation des NP à grande échelle nécessite de prendre des précautions. Par exemple, en mars 2006, le produit ménager « MagicNano » vendu en aérosol comme vitrifiant des surfaces de verre et de céramique a provoqué des détresses respiratoires chez 110 personnes dont 6 durent être hospitalisées. C'est l'extrême finesse des gouttelettes générées par le propulseur et les produits chimiques qu'elles contenaient qui ont causé ces troubles (German Federal Institute for Risk Assessment, 2006). Même si les NP ne sont finalement pas à l'origine des effets néfastes de ce produit, cet événement a souligné combien il est difficile aujourd'hui de caractériser les nanomatériaux.

La forte publicité faite autour de cet événement souligne aussi les inquiétudes du public face à ces technologies du futur.

Lors du Grenelle de l'environnement, il a été décidé de demander aux pouvoirs publics de réaliser un bilan coûts/avantages systématique de la mise sur le marché de produits contenant des nanoparticules ou nanomatériaux, soulignant ainsi la volonté d'instaurer un principe de précaution face aux NP. A partir des résultats des études en cours, des dispositions seront prises pour renforcer l'information et la protection des salariés et de la population (Maraninchi et Grimfeld, 2008).

1.3. Contexte et objectifs de l'étude

Parmi les NP les plus utilisées dans l'industrie, on distingue notamment les NP carbonées dont les nanotubes de carbone (NTC). Les caractéristiques et propriétés de cette NP sont décrites au paragraphe 2. Comme tous les produits des nanotechnologies utilisés dans l'industrie, il est vraisemblable que l'exposition des travailleurs puis du public soit amenée à augmenter si leur utilisation se développe. Il est donc important de caractériser au mieux la potentielle toxicité des NTC afin d'évaluer le risque. En raison de son faible poids et de sa structure, le NTC peut aisément se trouver en suspension dans l'air ambiant. Par conséquent, l'une des principales voies de pénétration des NTC dans l'organisme est la voie respiratoire.

Ainsi de nombreuses questions se sont posées. Les NTC induisent-ils une réponse inflammatoire ou un stress oxydant? Altèrent-ils ou détruisent-ils les cellules pulmonaires ? Quel est le devenir de ces particules dans le corps ? Franchissent-ils la barrière épithéliale pulmonaire? En quelle quantité ? Migrent-ils vers d'autres compartiments biologiques ? Ont-ils la capacité d'affecter le système nerveux, immunitaire, cardiovasculaire, reproducteur ? Ce sont quelques-unes des questions auxquelles nous allons tenter d'apporter des réponses.

Pour ce faire, trois grands axes ont été explorés lors de mon travail de thèse :

✓ Dans un premier temps, la caractérisation du NTC étudié a été réalisée afin de mettre au point une technique de dispersion fiable pour la réalisation d'expérimentations compatibles avec le milieu biologique.

✓ Dans un second temps, des analyses physiologiques, biochimiques, histologiques et moléculaires ont été réalisées *in vivo* sur animaux sains afin d'identifier les potentiels effets des NTC sur l'organisme.

✓ En parallèle, une étude de la distribution et de l'élimination des nanotubes au niveau pulmonaire a été effectuée.

2. Les nanotubes de carbone : quelques généralités.

2.1. Qu'est ce qu'un nanotube de carbone ?

Les NTC, ont été observés pour la première fois par Endo *et al.* en 1974 (Endo, 2002) et publiés par Iijima en 1991 (Iijima, 1991). Ils forment l'un des quatre états organisés connus du carbone sur terre, avec le graphite, le diamant et les fullerènes. Ils sont formés d'une feuille de graphène enroulée sur elle-même (Figure 1). On peut ainsi distinguer 2 types de NTC. Les NTC simple feuillet (SWCNT) ne possédant qu'une seule paroi et les NTC multi-feuillets (MWCNT) constitués par plusieurs parois concentriques où les atomes de carbone sont organisés en réseaux d'hexagones. Leurs dimensions varient de quelques microns à quelques dizaines de microns de longueur et de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres de diamètre. Au sein de cette structure, les atomes de carbone sont hybridés sous forme sp_2 comme dans le graphène (Dresselhaus *et al.*, 1996). A l'extrémité, les NTC peuvent ou non être fermés par un demi-fullerène comme représenté sur l'image ci-dessous.

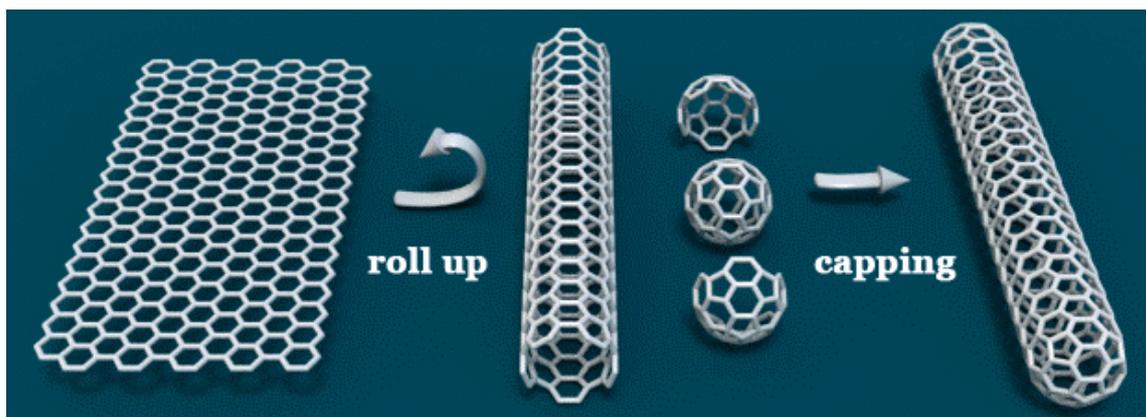


Figure 1 : Structure du SWCNT

2.2. Comment produire un nanotube de carbone ?

Lors de leur découverte, les NTC ont été produits par la méthode de décharge d'arc (Iijima, 1991). Depuis, de nombreuses méthodes ont été mises au point, conduisant préférentiellement à la production de NTC mono ou multi-parois avec un degré de pureté plus ou moins élevé.

2.2.1 Décharge électrique

Cette méthode nécessite la mise en place de 2 barreaux de graphite au niveau de l'anode et de la cathode. Une différence de potentiel d'environ 25V est alors appliquée sous un flux de gaz neutre tel que l'hélium afin d'assurer le refroidissement du système. Le passage d'un courant électrique (de 50 à 150 A) va alors entraîner la vaporisation des atomes de carbone présents au niveau de l'anode froide afin de permettre la croissance du NTC au niveau de la cathode chaude (environ 3000°C) (Figure 2) (Iijima, 1991).

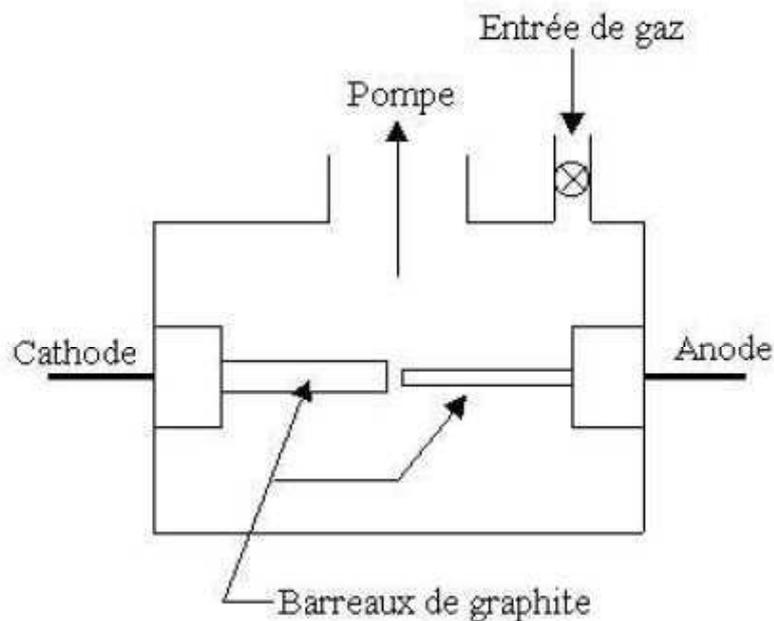


Figure 2 : Représentation schématique d'une chambre de croissance par décharge d'arc.

La production de nanotubes par cette méthode s'accompagne de la production d'impuretés carbonées comme le fullerène, le carbone amorphe et d'autres nanoparticules (Ajayan et Iijima, 1992). En présence de métaux de transition tels que le nickel, le fer ou le cobalt, on observe la production de SWCNT (Iijima et Ichihashi, 1993). Les MWCNT peuvent également être produits en utilisant un mélange de métaux (Fe/Ni, Co/Ni, Co/Pt) (Journet *et al.*, 1997). Les nanotubes ainsi obtenus nécessiteront une étape de purification car le rendement de cette méthode est seulement de 20%.

2.2.2 Vaporisation laser

Cette méthode consiste en l'évaporation d'une cible contenant du carbone, du nickel et du cobalt à l'aide d'un laser dans un four chauffé à 1200°C. Après avoir été produits à proximité de la cible avec un rendement de 70 à 80%, les NTC sont transportés à l'aide d'un flux d'argon au niveau d'un collecteur de cuivre refroidi par de l'eau. (Figure 3) (Guo *et al.*, 1995). L'utilisation de cette méthode conduit préférentiellement à la production de SWCNT.

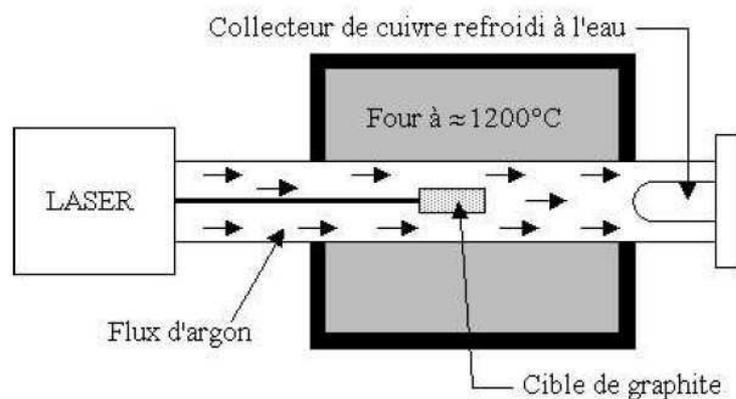


Figure 3 : Représentation schématique d'une chambre de croissance par vaporisation laser

2.2.3 Dépôt en phase vapeur (CVD)

Des molécules d'hydrocarbures ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-CH}_3$, CH_4) sont dissociées dans un four chauffé à 1200°C . La formation de nanotubes a lieu au niveau d'un substrat contenant des catalyseurs métalliques tels que le cobalt ou le nickel (Figure 4) (Cassell *et al.*, 1999).

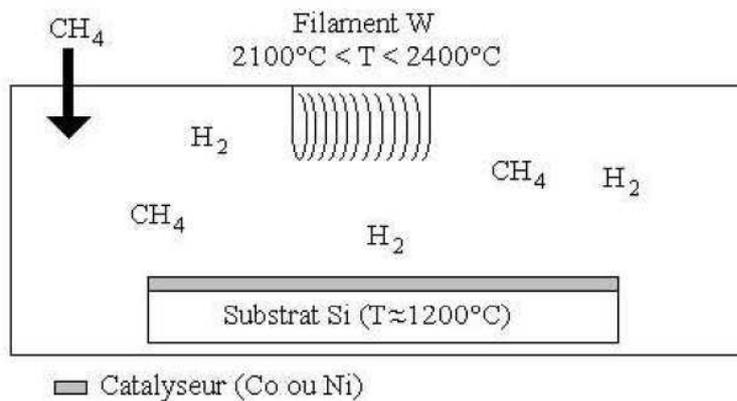


Figure 4 : Représentation schématique d'une chambre de croissance par CVD.

Quelle que soit la méthode de production utilisée, les nanotubes contiennent des impuretés qui sont en grande partie éliminées par des procédés de purification. Cependant, de faibles quantités d'impuretés ou de catalyseurs restent encore présentes.

2.3. Propriétés et applications des nanotubes de carbone

Si les NTC suscitent un tel engouement, c'est en particulier dû à leurs propriétés physico-chimiques qui permettent d'envisager leur utilisation dans de nombreux domaines industriels.

2.3.1 Propriétés électriques

Les NTC sont des semi-conducteurs, c'est-à-dire qu'ils offrent la capacité de réguler la quantité mais aussi la direction du courant d'un champ électrique. Cette régulation est rendue possible en agissant au niveau de la chiralité (Odom *et al.*, 1998) et des forces de traction exercées sur les NTC (Heyd *et al.*, 1997). Par ailleurs, les NTC possèdent également une

faible résistance électrique et sont capables d'annuler un champ magnétique (Brozdnichenko *et al.*, 2007). Ainsi, leur utilisation permettrait de minimiser les pertes d'énergie.

2.3.2 Propriétés mécaniques

Les NTC possèdent également des propriétés mécaniques remarquables. En dépit de leur faible taille, les NTC sont à l'heure actuelle le matériau le plus résistant sur la terre (100 fois plus résistants que l'acier et 4 fois plus que le fil d'araignée) (Yakobson et Smalley, 1998) et ils possèdent une grande élasticité (Lu, 1997).

2.3.3 Propriétés chimiques

Constitués d'atomes de carbone, les NTC sont très peu réactifs chimiquement. Seuls les pentagones et les défauts structuraux permettent d'initier les attaques chimiques. Ainsi, leur structure creuse permet, après l'ajout de métaux, d'envisager la production de nanofils ou encore, après fixation de molécules chimiques à la surface des NTC, de favoriser une réaction chimique (Hirsch, 2002).

2.3.4 Autres propriétés

La conductivité thermique des NTC est supérieure à celle du diamant. Par ailleurs, les NTC sont capables d'absorber 99,9% de la lumière, ce qui est 3 fois mieux que l'alliage nickel-phosphore réputé comme étant le matériau le plus sombre (Yang *et al.*, 2008)

2.3.5 Applications

En raison de ces nombreuses propriétés, la production mondiale de nanotubes de carbone atteint aujourd'hui plusieurs centaines de tonnes par an. Ils sont présents dans les écrans plats, les microprocesseurs, l'automobile (les pneumatiques, Renault et Peugeot expérimentent des

nanotubes de carbone en renfort des pièces de carrosserie), les articles de sport (le premier cadre de vélo comportant des nanotubes de carbone concourait au dernier tour de France, les raquettes de tennis), dans l'industrie pharmaceutique pour favoriser le passage de la barrière hémato-encéphalique ou en tant que vecteur de médicament... Plus précisément, dans le domaine médical, les NTC peuvent avoir de nombreuses applications (Boczkowski et Lanone, 2007). Par exemple, lors de maladies auto-immunes, des NTC interagissant avec des protéines spécifiques, permettraient la reconnaissance d'anticorps exprimés lors de ces maladies et d'en permettre le diagnostic (Chen *et al.*, 2003). Au niveau thérapeutique, Pantarotto et al. ont montré que des SWCNT fonctionnalisés sont capables de traverser la membrane d'un fibroblaste et de s'accumuler dans le cytoplasme sans induire de cytotoxicité (Pantarotto *et al.*, 2004). Ces résultats laissent envisager l'utilisation de ces particules comme vecteur de médicament. Enfin nous pouvons citer un dernier exemple d'utilisation en thérapie des NTC. Lors de leurs travaux, Kam et al. ont fonctionnalisé un SWCNT avec une protéine spécifique des récepteurs aux folates présents au niveau des cellules cancéreuses. Ils ont montré que des SWCNT ainsi fonctionnalisés se retrouvent dans le cytoplasme des cellules cancéreuses. Ainsi, et grâce à la capacité des SWCNT à absorber la lumière dans le proche infrarouge, les cellules cancéreuses peuvent être détruites (Kam *et al.*, 2005).

Un grand nombre d'autres applications connues sont ainsi recensées sur un site internet (Nanotechnologies-project, 2007). Cependant, les effets sur la santé humaine et l'environnement sont encore mal connus.

3. Toxicité des nanotubes de carbone

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

3.1 Les déterminants physiques influençant la toxicité des nanotubes de carbone

3.1.1. La surface spécifique

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

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

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

3.1.3. Les contaminants métalliques

Comme nous l'avons vu précédemment, la production des NTC nécessite l'utilisation de catalyseurs métalliques tels que le nickel, le cobalt ou encore le fer qui perdurent à l'état de traces dans les NTC. Or ces métaux possèdent des effets toxiques propres. Le fer est connu comme générateur d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables d'induire un stress oxydant. Le nickel modifie l'expression du gène codant pour la protéine HIF1 α , un facteur de transcription intervenant dans la régulation de gènes de l'inflammation et de l'apoptose (Kaczmarek *et al.*, 2007) Toutes les études portant sur la toxicité des NTC doivent donc tenir compte de la nature de son catalyseur métallique et de son degré de pureté. Aujourd'hui, il n'est pas possible d'obtenir des NTC purs en supprimant toute trace de catalyseurs. Il est donc intéressant d'identifier le rôle éventuel de ces métaux dans la toxicité potentielle des NTC.

3.1.4. La longueur des nanotubes de carbone

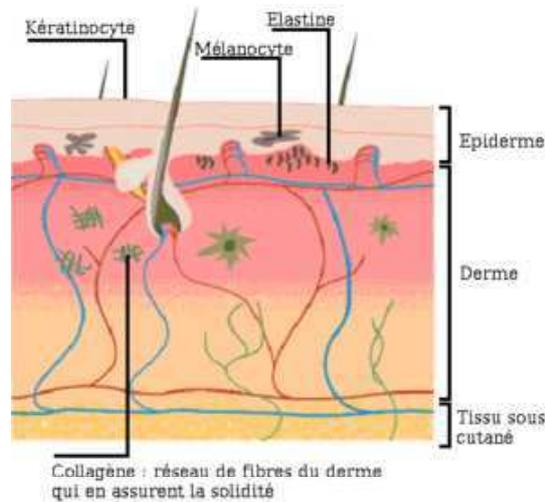
Enfin, la longueur des NTC ne peut être ignorée. En effet, suite à l'IT de 0,5 mg de MWCNT par rat, Muller *et al.* (2005) ont montré que des NTC dont la longueur est plus importante (0,7

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

3.2 Toxicité des nanotubes de carbone suite à un contact cutané

La peau constitue une barrière naturelle entre l'intérieur de l'organisme et le milieu extérieur (Figure 5). Elle limite ainsi l'entrée d'agents étrangers tels que les virus, les bactéries ou les polluants. Cette "barrière protectrice" n'est toutefois pas absolue, elle est perméable à pratiquement toutes les substances ; seul le degré de perméabilité varie. Il est lié principalement à l'état physiologique de la peau, aux propriétés physico-chimiques des composés dont elle est supposée restreindre l'entrée et à la nature du véhicule (liquide, air ambiant...) par lequel ces substances sont amenées au contact de la peau. Afin de mieux définir la toxicité d'un agent étranger, et en particulier des NTC, il est nécessaire de connaître le devenir de ces particules au niveau cutané et plus précisément, de savoir si l'on va observer un passage transcutané. Plusieurs questions se posent. Quelle va être la fraction de la dose appliquée réellement absorbée ? Quelle sera la disponibilité de cette fraction dans l'exercice d'une activité toxique locale et/ou systémique ? Quelle sera la concentration localisée dans les structures cutanées ou dans les tissus plus profonds ? Existe-t-il un mécanisme de clairance

épidermique et/ou dermique ou observera-t-on de l'accumulation dans les structures cutanées profondes.



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

Figure 5 : Représentation schématique de la peau vue en coupe.

Les NTC sont hydrophobes et par conséquent, ils sont soupçonnés de pouvoir traverser les barrières biologiques et notamment la peau. Les études *in vitro*, réalisées sur la toxicité cutanée des SWCNT fonctionnalisés par de l'acide 6-aminohexanoïque (AHA-SWCNT), ont montré qu'après 24h, des concentrations comprises entre $5 \cdot 10^{-5}$ et $5 \cdot 10^{-2}$ mg/ml entraînent une augmentation de la mortalité de kératinocytes humains (HEK). Ces lignées cellulaires présentent également une induction de l'expression de marqueurs de l'inflammation, l'IL-6 et l'IL-8, après 24 et 48h de traitement par 0,05 mg/ml de AHA-SWCNT (Zhang *et al.*, 2007). Au niveau structural et à l'aide de la microscopie électronique à transmission (MET), la formation de vacuoles a été observée au sein du cytoplasme des cellules HEK à cette même dose après 24h (Zhang *et al.*, 2007). Plusieurs études *in vitro* ont montré des effets irritants induits par les NTC. Par exemple, chez des cellules immortalisées d'épiderme humain (HaCaT), une induction de stress oxydant et une diminution du taux de glutathion et de vitamine E ont été notées suite au traitement par 0,06 à 0,24 mg/ml de SWCNT non modifiés

pendant 2 à 18h (Shvedova *et al.*, 2003). Comme pour les SWCNT, une augmentation de la mortalité des cellules HEK et de l'expression de l'IL8 a également été décrite pour des doses allant de 0,1 à 0,4 mg/ml de MWCNT (Monteiro-Riviere *et al.*, 2005).

Cependant, ces résultats ont été obtenus à partir de cellules immortalisées et il a été montré qu'il existe des différences significatives entre les effets observés sur des cellules immortalisées et des cultures primaires de kératinocytes. En effet, suite à une exposition de 0,1% de carburant, Allen *et al.* (2001) ont observé une induction de l'expression de l'IL8 sans variation de l'expression du TNF α sur des kératinocytes porcins en culture primaire. Cependant, ils ont également observés une inhibition de l'expression de l'IL8 et une induction de l'expression du TNF α sur une ligné cellulaire de kératinocytes porcins (MSK3877) (Allen *et al.*, 2001). Par ailleurs, Monteiro-Riviere *et al.* (2005) ont traité des cellules HEK par 0,1 à 0,4 mg/ml de MWCNT et ont également observé la présence de NTC au sein de vacuoles cytoplasmiques ainsi que l'augmentation de l'expression de l'IL8 (Monteiro-Riviere *et al.*, 2005).

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

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

Suite à une ingestion, les toxiques sont conduits au niveau de l'estomac puis de l'intestin où ils sont, soit absorbés, soit éliminés dans les fèces. L'absorption dépend de la nature de la particule, de ses propriétés physico-chimiques mais également de la nature des interactions qu'elle effectue avec les protéines présentes.

Comme lors de l'exposition par contact cutané, la toxicité des NTC induite par ingestion ou injection intraveineuse est très peu documentée. Seuls Wang et al (2004) ont montré que des SWCNT hydroxylés, marqués à l'¹²⁵I et injectés par gavage chez des souris étaient capables de se disperser dans l'estomac, les os et les reins, laissant supposer la capacité des SWCNT à être absorbés. Lors d'injection de NTC par voie intraveineuse, des résultats similaires ont été obtenus avec un SWCNT marqué par de l'¹¹¹In. Après injection chez des souris, les NTC ont été retrouvés dans les reins, le foie et la rate. De plus, l'étude pharmacocinétique a révélé une clairance rapide (McDevitt *et al.*, 2007 ; Singh *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2004). Par ailleurs, la biodistribution des SWCNT non modifiés a aussi été réalisée lors d'une étude faisant appel à la fluorescence intrinsèque de cette particule. Comme lors des précédentes études, les auteurs ont montré une clairance rapide. 1h après injection, la totalité des NTC ont été éliminés du sang et se sont localisés au niveau du foie. Après 24h, une partie des NTC injectés a été détectée dans les reins, laissant supposer une clairance urinaire de la particule (Cherukuri *et al.*, 2004). Ainsi, nous pouvons supposer que la fonctionnalisation des SWCNT entraîne également une modification de la distribution de celui-ci dans l'organisme. A ce jour, aucune étude n'a été publiée sur la toxicité des NTC au niveau des viscères abdominales (foie, reins, rate...). Seule une expérience préliminaire sur un faible nombre de souris a été réalisée sur 4 mois par l'équipe du professeur Gambhir de l'université de Stanford et a montré l'absence d'effet toxique des SWCNT au niveau du foie et de la rate. La présence de macrophages ayant

phagocyté les NTC a également été notée au niveau du foie mais sans entraîner d'anomalie au niveau tissulaire (Gambhir, 2008). Ces résultats forts intéressants, s'ils se confirment, laissent envisager l'utilisation des NTC dans des applications d'imagerie et de thérapies biomédicales.

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

Ce mode de pénétration représente la voie majeure d'exposition des travailleurs et de la population aux NTC. En effet, de par leur faible poids, les NTC peuvent aisément être mis en suspension dans l'air. Ainsi, toutes les étapes, de la production au stockage des NTC, peuvent conduire à l'exposition pulmonaire des manipulateurs. De même, le nettoyage, le perçage... de produits contenant des NTC au sein de leurs matrices sont sources d'exposition.

Lors de la respiration, une fraction des particules présentes dans l'air va être inspirée puis expulsé par expiration. Les particules résiduelles seront au contact de la muqueuse pulmonaire ou passeront à travers la barrière alvéolo-capillaire pour se retrouver dans le sang. Afin de comprendre la toxicité induite par les NTC, il faut donc dans un premier temps analyser les différents paramètres intervenant dans cette toxicité et en particulier, les cibles histologiques et cytologiques des NTC. Ces cibles peuvent être identifiées en analysant les sites de dépôt des NTC puis dans un second temps les paramètres intrinsèques aux NTC capables d'induire des effets toxiques.

3.4.1 Structure et types cellulaires de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est constitué de deux parties : une partie extra-thoracique comprenant les voies aériennes supérieures incluant les fosses nasales, le larynx et le pharynx et une partie intra-thoracique incluant la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires (Figure 6).

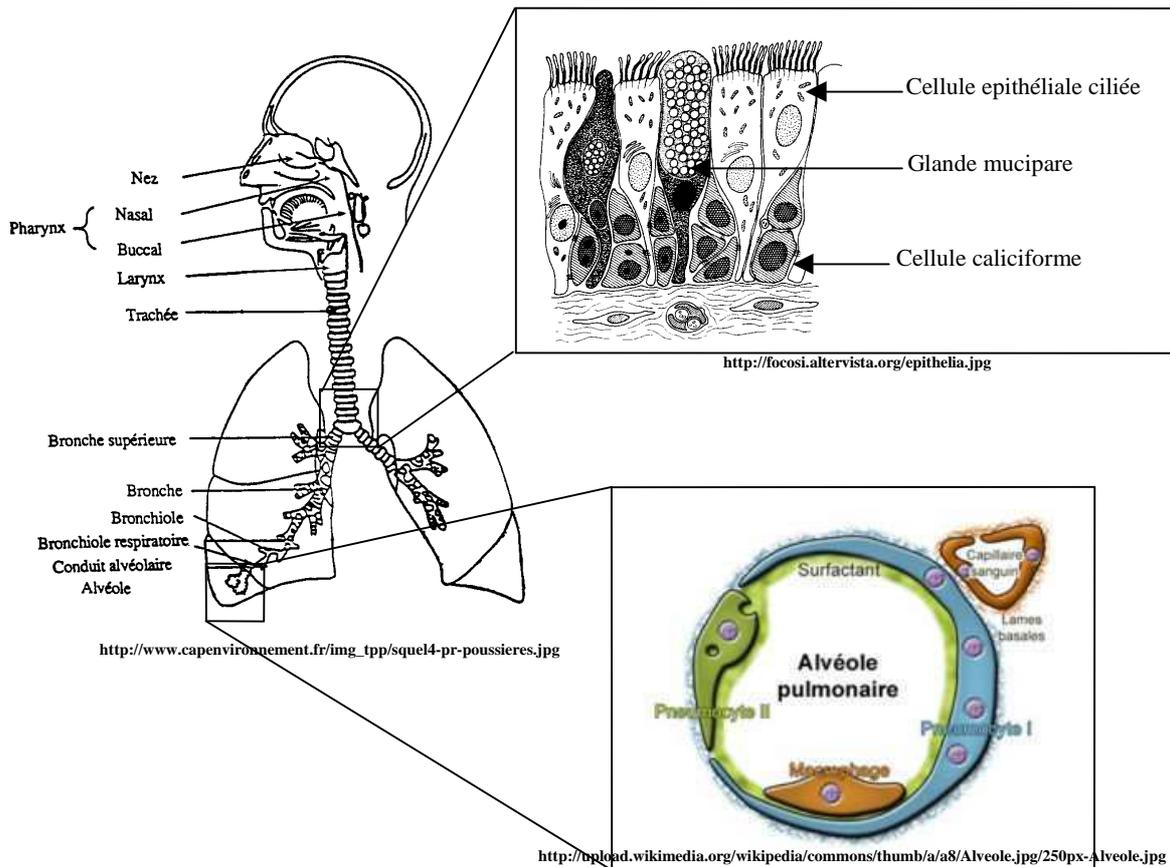


Figure 6 : Représentation schématique de l'appareil respiratoire

Les voies respiratoires supérieures sont tapissées de cellules épithéliales ciliées, recouvertes d'une couche de mucus sécrété par les cellules à mucus caliciformes et des glandes mucipares présentes dans l'épithélium bronchique. Le mucus sécrété a pour rôle de piéger les particules pénétrant dans les poumons et permet ainsi leur évacuation grâce à un mouvement de courant continu, entretenu par les cils des cellules épithéliales. Il sert également de rempart contre les stress chimiques grâce à un contenu riche en molécules anti-oxydantes (glutathion, acide ascorbique, acide urique,...) et en enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase,...) (Kelly, 2003).

Au niveau des bronchioles, les cellules de Clara sont capables de protéger les cellules environnantes contre les effets nocifs des substances toxiques et cancérigènes, de produire ou d'éliminer le surfactant et comme une cellule souche de donner naissance aux autres types

cellulaires bronchiques (Cottrell *et al.*, 1984 ; Kierszenbaum, 2006). Chez un individu sain au contact d'un cytotoxique, ces cellules peuvent sécréter des médiateurs de l'inflammation (IL1 β , IL6, IL8, TNF α , IFN γ ...) afin de participer au recrutement de cellules immunitaires (neutrophiles, basophiles, lymphocytes, macrophages...) et de conduire à l'élimination de celui-ci.

Au niveau du poumon profond, les alvéoles pulmonaires sont constituées de 3 types cellulaires : les pneumocytes de type I, les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires (Figure 6). Les pneumocytes de type I sont responsables des échanges gazeux avec le sang. Il s'agit de grandes cellules qui recouvrent 90% de la surface alvéolaire bien que leur nombre soit équivalent à celui des pneumocytes de type II. Les pneumocytes de type II sécrètent le surfactant pulmonaire capable de fluidifier le mucus et de faciliter les échanges gazeux. Les macrophages alvéolaires sont des cellules résidentes des poumons, présents, comme leur nom l'indique, dans la lumière alvéolaire et qui jouent un rôle majeur dans les mécanismes de défense innée de l'hôte. Ils assurent la phagocytose et la clairance du non soi ou encore l'activation des systèmes de défense spécifiques contre les éléments étrangers.

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

Un grand nombre de paramètres physico-chimiques influencent la pénétration et les interactions des nanoparticules avec les compartiments biologiques. Parmi ces paramètres, on distingue notamment le diamètre aérodynamique, la solubilité, la structure et la forme de la particule. Il a été montré que le diamètre aérodynamique d'une particule conditionnait étroitement sa pénétration au niveau de l'appareil respiratoire humain. Ainsi, des particules dont la taille est supérieure à 10 μm , sont arrêtées par la barrière nasale. Entre 2 et 10 μm , elles se déposent au niveau des voies aériennes supérieures et en dessous de 2 μm , elles atteignent le poumon profond (fraction alvéolaire) (Bair *et al.*, 2004). La déposition des

particules au niveau de l'appareil respiratoire à été étudiée à l'aide de particules marquées par des traceurs radioactifs (^{14}C ou ^{131}Ba) chez différentes espèces (tableau 1). Ces travaux montrent que, quelle que soit l'espèce, une fraction des particules inhalées est piégée au niveau de l'appareil respiratoire (environ 15 à 20% pour un diamètre moyen de 150 nm), la plus grande partie se trouvant au niveau du poumon profond (entre 10 et 25% selon l'espèce). Lorsque que le diamètre des particules diminue (80 nm), la déposition totale augmente et ce, de façon plus importante au niveau trachéobronchique et alvéolaire. En effet, les premiers modèles de déposition, réalisés pour des nanoparticules, ont prévu une augmentation de la quantité de nanoparticules déposées au niveau trachéobronchique et alvéolaire par rapport à ceux qui ont été observé avec les particules fines (Bair *et al.*, 2004). Ce modèle semble corrélér avec les premiers résultats expérimentaux chez le rat qui montrent que la déposition de nanoparticules ^{192}Ir au niveau trachéobronchique et pulmonaire est de 49% et 28% pour des particules dont la taille est respectivement de 15 et 80 nm (Kreyling *et al.*, 2002).

Tableau 1 : Déposition des particules au niveau de l'appareil respiratoire des mammifères.

	Diamètre des particules (μm)	Déposition (% de la quantité inhalée)			
		Nasopharynx	Trachée Bronches	Alvéoles	Totales
Rat (1 ; 2)	0,08	5	7	20	32
	0,1-0,2	9	4-5	10-11	15-17
Cobaye (3)	0,12	-	-	-	20
Souris (4)	0,1-0,2	-	-	-	18
Chien (4)	0,1-0,2	7	7	25	-
Homme (4)	0,1-0,2	-	5	15	-

(1) (Xu et Yu, 1987) ; (2) (Chan *et al.*, 1981) ; (3) (Lee *et al.*, 1983) ; (4) (McCellan *et al.*, 1982).

Les NTC sont particulièrement hydrophobes et sont par conséquent présents sous forme d'agglomérats. Aucune étude sur la déposition des NTC dans l'appareil respiratoire n'a encore été publiée. Cependant, un autre modèle, étudiant l'inhalation des radionucléides, permet de tenir compte de la taille et de la solubilité des particules (CIPR, 1994). Comme précédemment, ce modèle montre que, plus le diamètre des particules étudiées est petit, plus la pénétration au sein de l'arbre trachéobronchique est profonde. Par exemple, pour un diamètre de 0,1 μm , 29% des particules se déposent au niveau des alvéoles alors que, pour des particules de 5 μm , seulement 5% y parviennent. Si la taille est déterminante dans la localisation des particules au sein du tractus respiratoire, la solubilité joue un rôle important dans la clairance et le passage transmembranaire. En effet, plus la solubilité est importante, plus le transfert vers le sang sera rapide. A l'inverse, des composés peu solubles, tels que les NTC, ont un temps de séjour et d'épuration dans le tractus respiratoire qui sera plus long (CIPR, 1994). En se basant sur la solubilité et la localisation des particules présentes au niveau du tractus respiratoire, un mécanisme d'épuration a pu être modélisé. Il montre que les particules ayant traversé l'épithélium sont transportées au niveau des ganglions lymphatiques régionaux par les voies lymphatiques exclusivement. Les particules présentes au niveau des bronches et des bronchioles sont dirigées vers le tractus digestif par remontée muco-ciliaire avec une vitesse plus au moins rapide pour être éliminées dans les fèces. Enfin, les particules présentes au niveau alvéolaire sont éliminées, soit via les voies aériennes supérieures, soit via les voies lymphatiques. Quelle que soit la localisation des particules, un passage vers le sang ne peut cependant pas être éliminé (CIPR, 1994). Même si la déposition des NTC n'est pas encore documentée, Daigle et al. (2003) ont montré chez des patients sains que des particules ultrafines de carbone dont la taille est de 8,7 et 26 nm ont été retrouvées à hauteur de 66% et 80% respectivement au niveau des voies aériennes et du poumon profond au repos. Par ailleurs, ils observent également une augmentation significative du taux de déposition à 83 et

94% lorsque les sujets sont en exercice. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une importante fraction de la quantité de nanoparticules inhalées est capable de se déposer au niveau des voies aériennes trachéobronchique et alvéolaires et ce, de façon plus importante que pour des particules de plus grande taille (Daigle *et al.*, 2003). Comme indiqué précédemment, les NTC forment partiellement des agglomérats de tailles variables dans les milieux aqueux et notamment biologiques (Cheng *et al.*, 1998). Or, la taille des particules ou des agglomérats de particules joue un rôle clé dans sa localisation pulmonaire mais aussi dans sa toxicité (Oberdorster *et al.*, 2005). Il est donc indispensable de bien caractériser la taille et l'état d'agglomération des nanoparticules étudiées.

3.4.3 Toxicité pulmonaire des nanotubes de carbone

3.4.3.1 Altérations histopathologiques, stress oxydant et inflammation

Les premières études portant sur la toxicité des NTC *in vivo* ont été réalisées par IT. A de fortes doses, 0,1 à 0,5 mg/souris et 0,1 à 5 mg/rat, les auteurs ont montré l'apparition de granulomes au niveau des poumons des rongeurs (Lam *et al.*, 2004 ; Shvedova *et al.*, 2005 ; Warheit *et al.*, 2004) (Figure 7). Les granulomes pulmonaires sont des structures anatomopathologiques constituées d'un amas de cellules immunitaires (lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles, macrophages) au niveau du parenchyme pulmonaire et généralement dus à une réaction localisée face à la présence d'un élément étranger. Ils sont généralement accompagnés de la sécrétion par les cellules immunitaires de cytokines inflammatoires.

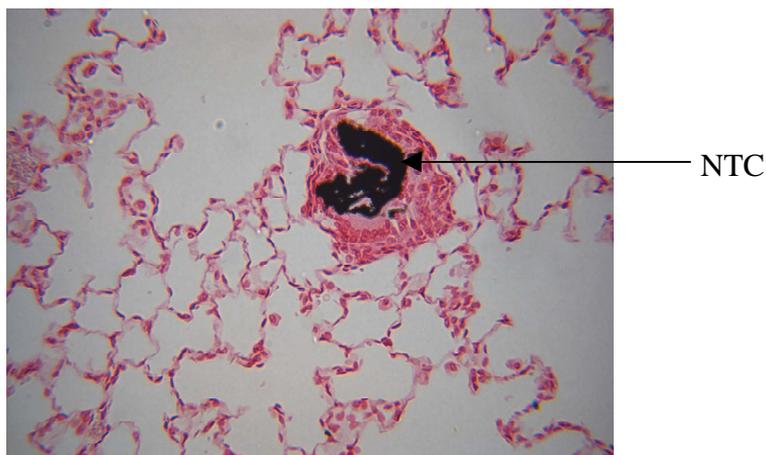


Figure 7 : Formation de granulome au niveau des alvéoles pulmonaires d'un rat traité par 0,5 mg de NTC (photographie INERIS).

Dans le cas des NTC, les granulomes ont été décrits au niveau alvéolaire (Shvedova *et al.*, 2005 ; Warheit *et al.*, 2004) mais également au niveau de l'interstitium pulmonaire (Lam *et al.*, 2004) suite à 1 semaine d'exposition et pour une durée minimale de 3 mois (Warheit *et al.*, 2004).

Associé à ces granulomes se développe une réaction fibrosante dont les origines sont encore mal connues (Mangum *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2005). Cette fibrose se caractérise par un épaissement du tissu alvéolaire en présence de SWCNT composé de collagène et d'élastine. Dès 60 jours, Muller et al (2005) montrent une augmentation de la quantité de collagène suite au traitement par 0,5 mg/rat de MWCNT. Ces données sont appuyées par une augmentation du taux de TGF β dès 7 jours suite au traitement de rats par 0,4 mg de SWCNT qui peut s'associer au développement du tissu fibrotique (Mangum *et al.*, 2006).

Enfin, il a également été observé qu'à la suite d'expositions de souris par 10 à 40 μ g de SWCNT, des espèces activées de l'oxygène (ROS) étaient présentes dans le lavage broncho-alvéolaire (BAL) (Pulskamp *et al.*, 2007). Si elles sont maîtrisées, les ROS ne présentent pas de grand danger. Cependant, leur surexpression conduit au développement d'un stress

oxydant qui peut être à l'origine d'une inflammation, de mutagenèses... et est considéré comme jouant un rôle dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardio-vasculaires ou encore l'arthrite rhumatoïde.

Sur le plan inflammatoire, différents travaux ont montré une augmentation de neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et macrophages alvéolaires dans le LBA de souris traitées par 0,01 à 0,5 mg de SWCNT (Lam *et al.*, 2004 ; Shvedova *et al.*, 2005) ou de rats traités par 0,5 à 2 mg de MWCNT (Muller *et al.*, 2005). Ces observations sont associées à l'augmentation de la quantité de cytokines proinflammatoires et notamment du TNF α , de l'IL1 β et de l'IL8 (Muller *et al.*, 2005 ; Shvedova *et al.*, 2005). *In vitro*, l'exposition de cellules épithéliales humaines A549 à des doses croissantes comprises entre 0 et 800 μ g/ml de SWCNT montre une induction significative de la mortalité de 41 et 52% pour des doses de 400 et 800 μ g/ml uniquement. Aux plus faibles doses, aucune cytotoxicité n'a été significativement notée (Davoren *et al.*, 2007). Cependant, la sécrétion de cytokines de l'inflammation a aussi été quantifiée lors d'une exposition par 0,1 mg/ml de SWCNT d'une lignée de macrophages alvéolaires (RAW 264,7). Ainsi, les inductions de l'expression du TNF α , de l'IL1 β et du TGF β ont été montrées (Shvedova *et al.*, 2005). Une question peut donc se poser : les effets inflammatoires observés sont-ils dus à la présence des NTC ou à l'état d'agglomération de ceux-ci ?

Lors des études menées par IT, les NTC étudiés ont été dispersés dans du PBS (Shvedova *et al.*, 2005), du PBS ou du NaCl en présence de Tween 80 (Muller *et al.*, 2005 ; Warheit *et al.*, 2004) ou encore en présence de sérum (Lam *et al.*, 2004). Cependant, ces méthodes ne permettent pas la production d'une grande majorité d'agglomérats respirables, c'est à dire de tailles inférieures à 10 μ m. Récemment, deux études d'inhalation ont été effectuées suite à la production d'un aérosol contenant des agglomérats de NTC de tailles respirables (Li *et al.*, 2007 ; Mitchell *et al.*, 2007). Mitchell *et al.* ont exposé, chaque jour, pendant 6h, des souris à

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

toxicité des NTC et la nécessité de prendre en compte de multiples paramètres (Tableau 2 et 3).

Tableau 2 : Synthèse des résultats obtenus lors des principales études par instillation intratrachéale portant sur la toxicité des NTC in vivo.

Auteurs	Espèce	Type de NTC Dose/animal	Dispersant	Lésions pulmonaires	Signes cliniques	Inflammation	Effets cellulaires
Shvedova et al. (2005)	Souris	SWCNT 0 à 40 µg	PBS	Granulomes		↑ Lymphocytes ↑ Macrophages ↑ Neutrophiles ↑ TNF α , IL1 β	Apoptose (↑ Caspase 3 ↑ Cellules apoptotiques)
Lam et al. (2004)	Souris	SWCNT 0,1 à 0,5 mg	Sérum inactif	Granulomes	Mortalité (0,5 mg/souris) Perte de poids	↑ Neutrophiles ↑ Eosinophiles	Nécrose
Warheit et al. (2004)	Rat	SWCNT 0,2 à 1 mg	PBS + 1% de Tween 80	Granulomes	Mortalité (5 mg/kg) ↑ poids des poumons	↑ Cellules totales ↑ Neutrophiles	↑ du taux de LDH
Muller et al. (2005)	Rat	MWCNT 0,5 à 5 mg	NaCl + 1% de Tween 80	Fibrose		↑ Neutrophiles ↑ Eosinophiles ↑ TNF α	↑ du taux de LDH
Mangum et al. (2006)	Rat	SWCNT 0,4 mg	PBS + 1% de surfactant pluronic F-68	Granulomes Fibrose			
Li et al. (2007)	Souris	MWCNT 0,05 mg	NaCl + 1% de Tween 80	Destruction de la structure alvéolaire		↑ Cellules inflammatoires	
Mercer et al. (2008)	Souris	SWCNT 10 µg	Acétone + PBS	↑ collagène dans l'interstitium		↑ Neutrophiles ↑ Macrophages (1 et 7 jours)	

Tableau 3 : Synthèse des résultats obtenus lors des principales études par inhalation portant sur la toxicité des NTC *in vivo*.

Auteurs	Espèce	Type de NTC Dose/animal (mg/m ³) Temps d'exposition Dose calculée	Lésions pulmonaires	Inflammation
Mitchell et al. (2007)	Souris	MWCNT 0,3 à 5 mg/m ³ 7 et 14 jours 6,7 à 90 mg		→ Cellules inflammatoires → IL6, IL10, NQO1 (ARNm) → IL10 (protéine)
Li et al. (2007)	Souris	MWCNT 32,6 mg/m ³ 8 à 24 jours 0,07 à 0,21 mg	Amincissement des parois alvéolaires	
Shvedova et al. (2008)	Souris	SWCNT 5 mg/m ³ 1 à 4 jours 5 à 20 µg	Granulomes Fibrose Stress oxydant ↑ collagène	↑ Neutrophiles (1 et 7 jours) ↑ Macrophages (7 et 28 jours) ↑ Cellules totales (7 et 28 jours) ↑ Protéines totales ↑ LDH, TNFα, TGFβ, IL6

→ Pas de variation

↑ Augmentation/Induction

3.4.3.2 Effets cancérigènes des nanotubes de carbone

Une étude récente réalisée *in vivo* a montré que des MWCNT pouvaient induire une réponse similaire à l'amiante (Takagi, 2008). Lors de leurs travaux, Takagi *et al.* ont traité des souris p53 +/- en leur injectant 3 mg d'une suspension d'agglomérats de MWCNT, d'amiante ou de fullerènes dans la cavité péritonéale. 10 et 25 semaines après l'injection, les animaux ont été examinés. Comme attendu, aucune lésion n'a été observée suite au traitement par des fullerènes. Cependant, en présence d'amiante et de MWCNT, la formation de lésions cancéreuses et l'apparition d'un mésothéliome ont été rapportées. Bien qu'intéressants, les résultats de cette étude doivent être pris avec précaution. En effet, lors de ces travaux, les suspensions de MWCNT produites ont conduit à la formation de gros agglomérats qui naturellement ne pourraient pas atteindre la cavité péritonéale. De plus, les doses injectées dans la cavité péritonéale (3 mg/souris) sont très élevées et ne pourraient pas être atteintes même lors d'une exposition continue chez l'homme (Oberdörster, 2008). Enfin, l'injection de particules dans la cavité intrapéritonéale n'est pas physiologique et, sans tenir compte de la difficulté d'extrapoler à l'homme des résultats obtenus chez la souris, nous pouvons nous demander si les NTC inhalés ont la capacité d'atteindre le mésothélium pulmonaire (plèvre) et à des concentrations suffisantes pour y induire un effet.

Au niveau cellulaire, des effets génotoxiques ont également été rapportés récemment. *In vivo* après injection chez des rats de 0,5 ou 2 mg de MWCNT par IT, et *in vitro*, suite au traitement de deux lignées cellulaires épithéliales (MCF-7, issues d'un cancer du sein chez l'homme et RLE, issues d'épithélium pulmonaire de rat) par 10, 20 ou 50 µg/mL, la formation de micro noyaux a été observée (Muller *et al.*, 2008). Ces résultats mettent en évidence des effets clastogènes et aneugènes induits par des MWCNT dont les conséquences suite à une exposition humaine restent à confirmer et à comprendre.

3.4.3.3 Comparaison de la toxicité des nanotubes de carbone et de l'amiante

En raison de la structure fibrillaire des NTC, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que leur toxicité pourrait être comparable à celle de l'amiante. Afin d'obtenir quelques éléments de réponse, différents paramètres représentatifs de la toxicité de ces particules ont été comparés par plusieurs auteurs suite à une exposition aux NTC et à l'amiante. *In vitro*, la cytotoxicité des NTC et de l'amiante a été évaluée sur des cellules mésothéliales humaines où il a été montré qu'un SWCNT avait une cytotoxicité équivalente à celle de l'amiante (Wick *et al.*, 2007). Cependant, dans le même temps, l'étude d'un autre SWCNT aux mêmes concentrations (50 µg/ml), avait présenté un effet cytotoxique inférieur à l'amiante tout en induisant un stress oxydant et une activation des voies oncogéniques dans ces cellules (Pacurari *et al.*, 2008). *In vivo*, l'étude de biomarqueurs proinflammatoires semble révéler que les effets induits par les NTC multi-feuillets sont équivalents à ceux induits par la chrysotile après instillation intratrachéale (Muller *et al.*, 2005) et à l'amosite après injection intrapéritonéale (Poland *et al.*, 2008). En effet, lors de leurs travaux, Poland *et al.* ont montré, suite à une injection intrapéritonéale de 50 µg/souris de fibres de MWCNT et d'amiantes de taille variable, que seules les souris exposées à de longues fibres d'amiante et de MWCNT présentaient une augmentation du nombre de cellules proinflammatoires après 24h ainsi qu'une formation de granulomes après 7 jours. Cependant, ces effets, équivalents à ceux de l'amiante, observés uniquement en présence de fibres de NTC de longue taille (13 à 56 µm), n'ont pas été observés en présence de fibres de NTC de courte taille (1 à 5 µm) (Poland *et al.*, 2008). Les auteurs expliquent que la présence de lésions serait due à l'impossibilité pour les macrophages de phagocytter de trop gros agglomérats de NTC. Ce mécanisme, appelé «phagocytose frustrée», conduit naturellement à l'expression de protéines proinflammatoires et à la formation de lésions (Poland *et al.*, 2008). Enfin, il a également été montré que l'injection intrapéritonéale de MWCNT, dont la taille est comprise entre 2 et 20 µm, de long

induisait la formation de mésothéliomes avec une incidence un peu supérieure à la crocidolite (Takagi, 2008). Si l'ensemble de ces résultats fournissent un certain nombre d'information sur la toxicité des NTC et de l'amiante, ils ne permettent malheureusement pas encore d'aboutir à une conclusion quant à d'éventuels effets similaires des NTC et de l'amiante. L'influence de la taille et de l'état d'agglomération semble ici encore être un facteur clef de l'effet des NTC et reste à déterminer afin de prédire de possibles effets équivalents entre ces deux particules.

4. Résultats et discussion

Comme nous l'avons vu précédemment, l'état d'agglomération et par conséquent la méthode de dispersion, influence les propriétés physico-chimiques et *de facto* la toxicité induite par les NP. Lors ma thèse, nous avons choisi d'étudier la toxicité d'un MWCNT distribué par Sigma-Aldrich (Cat n° 636649) et produit selon la méthode CVD. Son diamètre mesure entre 20 et 50 nm et sa longueur est comprise entre 0,5 et 2 μm d'après les spécifications du fournisseur. Lors de ce travail, nous avons étudié l'état d'agglomération de ce MWCNT mais aussi différents aspects de sa toxicité, en cherchant à mettre en évidence d'éventuels effets inflammatoires, fibrosants, respiratoires ou encore histopathologiques, puis dans un second temps, en étudiant la biopersistance, la pharmacocinétique et la clairance de ce MWCNT.

Les résultats, obtenus au cours de ma thèse, sont présentés sous la forme de 3 articles :

1. Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode de dispersion des NTC et nous avons analysé l'impact de cette méthode sur la dispersion des MWCNT ainsi que sur les variations potentielles de la toxicité *in vivo* et *in vitro* (Article 1).
2. Une fois établie, cette méthode nous a permis de traiter des rats par instillation intratrachéale avec ces MWCNT afin d'identifier au niveau systémique mais aussi au niveau pulmonaire d'éventuels effets toxiques (Article 2).
3. En raison de leur faible taille et de leur structure, les NTC sont suspectés de pouvoir traverser les barrières biologiques et notamment la barrière alvéolo-capillaire. Nous avons donc cherché en parallèle à analyser ce phénomène et à comprendre le devenir des MWCNT dans l'organisme après IT (Article 3).

4.1. Effet de la BSA sur la dispersion des nanotubes de carbone pour les études *in vivo* et *in vitro*

Nanotoxicology, Décembre 2007, 1(4) : 266-278.

4.1.1. Introduction à l'article

Les effets toxicologiques induits par les NTC et observés *in vivo* suite au traitement de rats par IT ou par inhalation ne semblent pas converger. Les différences observées peuvent être liées au moins en partie à la méthode ou plus particulièrement à la suspension de NTC utilisée. Comme nous l'avons vu précédemment, le processus respiratoire normal va bloquer, au niveau des voies aériennes supérieures, l'entrée des particules dont la taille est supérieure à 10 µm. Or, lors d'une instillation intratrachéale, l'ensemble des particules injectées va se retrouver au niveau du poumon profond au sein des alvéoles pulmonaires. Par conséquent, il est indispensable de mettre au point une méthode de dispersion compatible avec le milieu biologique et capable de produire des agglomérats de NTC de taille respirable avant tout traitement par IT. Les travaux déjà publiés ont utilisé des NTC dispersés par sonication dans du NaCl ou du « phosphate buffer saline » (PBS) en présence de Tween 80 ou de sérum. Nous avons cherché ici à connaître l'effet de ces agents dispersants sur différents types de NTC et d'identifier celui qui induit le minimum d'interférences biologiques tout en favorisant la formation de petits agglomérats.

4.1.2 :

ARTICLE 1

4.1.3. Résumé de l'article

Lors de ce travail, nous avons dans un premier temps étudié l'état d'agglomération des NTC au sein de suspensions utilisées dans la littérature (sonication des NTC en présence de sérum ou de tween 80 dans du PBS ou du NaCl) que nous avons ensuite comparé à une suspension de NTC dispersés par de la BSA.

L'utilisation de Tween 80 en tant qu'agent dispersant des NTC se révèle être cytotoxique à de très faibles doses ($>0,1\%$) et notamment aux doses nécessaires pour entraîner une bonne dispersion de cette particule. En comparant la granulométrie des NTC en suspension avec les différents agents dispersants aux concentrations fréquemment utilisées, nous avons observé visuellement, en microscopie optique et en microscopie électronique à transmission (MET), que les NTC étaient mieux dispersés en présence d'albumine. La suspension ainsi produite contient de plus petits agglomérats qu'en présence de Tween 80 ou de sérum. En effet, plus de 65% des NTC dispersés selon cette méthode forment des agglomérats de taille comprise entre 2,5 et 10 μm , correspondant à une taille respirable, contre seulement 53% en présence de NaCl. De plus, nous avons observé l'absence de gros agglomérats ($> 80 \mu\text{m}$) contrairement aux suspensions témoins. Souhaitant étudier des NTC dont la structure n'est pas modifiée, nous avons analysé l'effet d'une sonication de faible puissance (40 W). Les résultats obtenus au MET ne montrent aucune modification de la taille et de la structure des NTC. Ainsi, nous avons montré que cette méthode permet l'obtention d'une bonne dispersion des NTC tout en conservant leur structure native. Par ailleurs, même si l'albumine favorise la dispersion des NTC en solution aqueuse, des mesures de stabilité montrent qu'après 24h, les agglomérats deviennent de plus en plus gros, suggérant la nécessité de produire la suspension immédiatement ou au maximum 24h avant l'expérimentation. Si un tel effet dispersant a pu être observé, c'est en particulier dû aux propriétés amphiphiles de l'albumine, à la présence

des forces de van der Waals et du phénomène de physisorption qui régit les interactions entre les NTC et la protéine. Une fois établies, ces interactions vont avoir la capacité de favoriser la dispersion des NTC en milieu aqueux et de permettre la formation de petits agglomérats.

Dans un second temps, nous avons souhaité savoir si l'utilisation de BSA en tant qu'agent dispersant entraînait une modification de la toxicité *in vivo* et *in vitro* des NTC.

Pour répondre à cette question, nous avons traité deux lignées cellulaires (A549 et U937) par des suspensions de NTC à des concentrations comprises entre 0 et 2 mg/ml et en présence de BSA à des concentrations de 0, 0,5 mg/ml ou à une concentration égale à celle des NTC. La cytotoxicité du MWCNT 20-50 a alors été analysée à l'aide de tests classiques de cytotoxicité (MTT et Bleue Alamar). Suite à la mise en contact de cellules et des NTC, nous avons constaté l'existence d'interférences entre les mesures spectroscopiques et les NTC. Ces interférences ont pu facilement être neutralisées en transférant le surnageant obtenu en fin d'expérience dans de nouvelles plaques de culture avant la lecture de la densité optique. Nous avons ainsi démontré que les NTC n'induisent pas de mortalité cellulaire sur les cellules épithéliales humaines A549 pour des concentrations inférieures à 0,5 mg/ml. Seulement 15% et 40% de mortalité ont respectivement été observées à 0,75 et 1 mg/ml. En parallèle, nous avons noté que les NTC induisaient une mortalité plus importante sur des lignées de macrophages alvéolaires U937 (15% à 10^{-3} mg/ml et 85% à 0,5 mg/ml). Au-delà de l'effet cytotoxique, nous avons surtout constaté que l'utilisation de BSA ne modifiait pas l'effet induit par les NTC sur les cellules et qu'elle permettait d'obtenir des résultats plus reproductibles se traduisant par un écart-type plus faible, par rapport à une suspension en milieu salin seul.

In vivo, nous avons traité des rats par 100 µg de MWCNT administrés par IT (150 µl d'une suspension de 0,7 mg/ml). Comme lors des expériences *in vitro*, la présence de BSA ne semble pas modifier la toxicité induite par les MWCNT. Il a cependant été observée une

augmentation de la quantité de cellules pulmonaires présentes dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA), et plus particulièrement de la quantité de macrophages alvéolaires, en présence d'agglomérats de plus petite taille. Cette augmentation cellulaire s'accompagne de l'augmentation de la quantité de cellules phagocytant les MWCNT, suggérant qu'une diminution de la taille des agglomérats favorise la phagocytose et peut-être l'élimination des NTC présents dans le poumon.

En conclusion, ce travail nous a permis de mettre en évidence que l'utilisation de l'albumine, constituant naturel du surfactant pulmonaire, en tant qu'agent dispersant des NTC, se révèle être intéressante car elle permet de favoriser la dispersion des NTC sans modifier leur structure ou leur toxicité. De plus, la BSA permet d'améliorer la reproductibilité des expérimentations en raison du fait que les suspensions produites ont une concentration plus proche de celle attendue. Ainsi, lors de traitements d'animaux par IT, les agglomérats de NTC injectés seront majoritairement de taille respirable et permettront d'imiter au mieux les conditions physiologiques de la respiration.

4.2. Induction de l'apoptose et absence d'effets proinflammatoires dans le poumon de rat suite à une exposition à des nanotubes de carbone multi-feuillets par instillation intratrachéale.

Toxicology, Novembre 2008, 253 : 131-136.

4.2.1. Introduction à l'article

Les premières études de toxicité *in vivo* réalisées sur les NTC ont montré l'augmentation de la quantité de protéines et de cellules proinflammatoires ainsi que la formation de structures anatomopathologiques au niveau pulmonaire (granulomes et fibrose). Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés lors de deux travaux portant sur la toxicité des NTC suite à des expositions par inhalation (Li *et al.*, 2007 ; Mitchell *et al.*, 2007). Li et al. ont même observé la formation de granulomes et la production de protéines proinflammatoires suite à l'IT de NTC. Ces granulomes n'ont pas été observés suite au traitement de souris par inhalation de cette même particule. Ces résultats suggèrent que les effets toxiques décrits précédemment pourraient être liés à la méthode de traitement utilisée et pas au NTC. Malgré tout, il est intéressant de noter que lors du traitement des animaux par IT, la dispersion des NTC réalisée par Li et al. a été effectuée en présence de Tween 80. Or, nous avons montré que les NTC étaient mieux dispersés en présence de BSA. Nous posons donc ici l'hypothèse que les effets délétères attribués au NTC pourraient au moins en partie être dus à l'injection de gros agglomérats de NTC au niveau du poumon profond. Cette présence, qui physiologiquement ne pourrait avoir lieu en raison de l'existence de barrières au niveau des voies aériennes supérieures, entraînerait les effets toxiques décrits.

4.2.2 :

ARTICLE 2

4.2.3. Résumé de l'article

Afin de caractériser au mieux les potentiels effets toxiques induits par les MWCNT étudiés, des rats ont été instillés par 1, 10 ou 100 µg (150 µl de suspension à 0,0007, 0,007, 0,7 mg/ml) de MWCNT dispersés dans une solution de NaCl contenant 0,005, 0,05, 0,5 mg/ml de BSA respectivement. 1, 7, 30, 90 et 180 jours après à l'instillation, nous avons analysé différents paramètres physiologiques. Plus précisément, nous avons regardé l'évolution du poids et de la croissance des rats ainsi que certains paramètres de la fonction respiratoire dont le temps d'inspiration (Ti), le temps d'expiration (Te), le temps de relaxation (RT), la variation de pression au sein de l'enceinte contenant les animaux pendant l'expiration (PEP) et l'inspiration (PIP), le volume courant (Vt) et le Penh. Ce dernier paramètre est une donnée calculée à partir des variations de pression aux temps inspiratoires (PIP) et expiratoires (PEP) et reflétant la présence d'une bronchoconstriction ($Penh = \frac{Pause \times PEP}{PIP}$ ou la $Pause = \frac{Te - RT}{RT}$) (Hamelmann *et al.*, 1997). L'ensemble des mesures réalisées sur ces paramètres ne révèle aucune modification physiologique induite par les NTC dispersés dans de la BSA.

Nous avons alors regardé si, lorsqu'ils forment de petits agglomérats, les MWCNT étaient capables d'induire la biosynthèse de marqueurs inflammatoires et du stress oxydant ou la formation de granulomes. Suite au même traitement que décrit précédemment, de nombreux ARNm (IL-1β, IL-6, IFNγ, COX2, iNOS) issus du poumon total et des protéines (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ, TNFα), marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant, ont été respectivement dosés par PCR (polymerase chain reaction) quantitative et ELISA selon la technologie Luminex® dans le LBA. Les résultats obtenus ne montrent pas de variation de l'expression de ces biomarqueurs suite à l'instillation de rats par des MWCNT aux temps

considérés. De même, l'analyse histologique des poumons n'a pas permis d'observer la présence de granulomes induits par les MWCNT à 1, 7, 30, 90 et 180 jours après l'exposition. Nous pouvons donc conclure que le MWCNT étudié n'induit pas d'inflammation, de stress oxydant et de granulomes lorsqu'ils sont dispersés par de la BSA. Récemment, Dutta et al. ont montré que l'albumine est la protéine contenue dans le sérum qui se fixe préférentiellement sur les NTC (Dutta *et al.*, 2007). Une explication probable serait que l'albumine interagisse avec les MWCNT l'empêchant d'exercer ses effets toxiques. Cependant, la concentration en albumine utilisée pour disperser les MWCNT (7,5 μM) est environ 100 fois inférieure à celle présente en condition physiologique au niveau du surfactant pulmonaire de rat (640 μM). Ainsi, la quantité d'albumine ajoutée lors de la mise en suspension de la particule peut être considérée comme négligeables.

Par ailleurs, ce travail met en évidence la présence des MWCNT au sein de macrophages alvéolaires. Cette observation suggère que ces cellules soient capables de phagocyter les NTC. De plus, nous avons montré que les MWCNT sont capables d'induire l'apoptose des macrophages alvéolaires *in vivo* et *in vitro*. Associés à l'absence d'inflammation, de stress oxydant et de granulomes, ces deux derniers résultats laissent supposer que de petits agglomérats de NTC pourraient être pris en charge par les macrophages alvéolaires. Nous devons donc nous demander si l'apoptose observée conduira, à plus long terme (plus de 6 mois), en l'activation de processus pathologiques, ou si elle constitue une étape du mécanisme d'élimination des NTC présents au sein du poumon.

4.3. Biodistribution et clairance de nanotubes de carbone instillés dans les poumons de rats.

Particle and fibre toxicology, Décembre 2008, 5 : 20, en cours d'impression

4.3.1. Introduction à l'article

L'étude de la toxicité pulmonaire d'une particule implique l'analyse de sa biopersistance, de sa clairance mais aussi de son passage alvéolo-capillaire. Or, les NTC sont constitués uniquement d'atomes de carbone. Ainsi, leur dosage est particulièrement difficile en milieu biologique. Pour essayer d'appréhender au mieux cet aspect de la toxicité des NTC, plusieurs auteurs ont greffé des particules radiomarquées à la surface de NTC. Cependant, cette modification entraîne également une modification du comportement du NTC dans le milieu biologique et de fait une modification de sa toxicité. Nous avons vu que les NTC sont produits en présence de métaux nécessaires à catalyser leur synthèse. Nous proposons donc ici d'analyser la liaison qu'il existe entre les NTC et les résidus métalliques n'ayant pas été éliminés suite à leur purification. Dans un second temps, si ces métaux se révèlent être de bons traceurs, c'est à dire s'ils restent fixés aux NTC dans l'organisme, nous étudierons la biodistribution, la biopersistance et le mécanisme de clairance des MWCNT dans le poumon.

4.3.2 :

ARTICLE 3

Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung.

Elgrabli¹ D, Floriani² M, Abella-Gallart¹ S, Meunier¹ L, Gamez¹ C, Delalain¹ P, Rogerieux¹ F, Boczkowski^{3,4} J and Lacroix¹ G

¹Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Verneuil en Halatte, France, ²Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire Cadarache (IRSN), Saint Paul les Bains, France, ³Inserm, U700 ; Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot-site Bichat, Paris, France, and ⁴Centre d'Investigation Clinique 007 ; Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.

Correspondence: Dan Elgrabli, DRC TOXI, INERIS, BP2 Parc Technologique ALATA, 60550 Verneuil en Halatte, France. Phone: +33 3 44 55 67 90 Fax: +33 3 44 55 66 05. Email: dan.elgrabli@ineris.fr

E-mail addresses of all authors:

Elgrabli D: dan.elgrabli@ineris.fr
Floriani M: magali.floriani@irsn.fr
Abella-Gallart S: Steve.Abella-Gallart-Etudiant@ineris.fr
Meunier L: Laurent.MEUNIER@ineris.fr
Gamez C: Christelle.GAMEZ@ineris.fr
Delalain P: Patrice.DELALAIN@ineris.fr
Rogerieux F: Francoise.Rogerieux@ineris.fr
Boczkowski J: jorge.boczkowski@inserm.fr
Lacroix G: Ghislaine.LACROIX@ineris.fr

Abstract

Background: Constituted only by carbon atoms, CNT are hydrophobic and hardly detectable in biological tissues. These properties make biokinetics and toxicology studies more complex.

Methods: We propose here a method to investigate the biopersistence of CNT in organism, based on detection of nickel, a metal present in the MWCNT we investigated.

Results and conclusion: Our results in rats that received MWCNT by intratracheal instillation, reveal that MWCNT can be eliminated and do not significantly cross the pulmonary barrier but are still present in lungs 6 months after a unique instillation. MWCNT structure was also showed to be chemically modified and cleaved in the lung. Long-time presence of MWCNT in the lung is associated with lung induction of cytochrome P450 1A1 and 2E1 mRNA suggesting a possible role of these enzymes in MWCNT clearance. These results provide the first data of CNT biopersistence and clearance at 6 month after respiratory administration.

Keywords: Carbon nanotube, clearance, pharmacokinetics, rat instillation, nanotoxicology.

Introduction

Given the low diameter of carbon nanotube (CNT), a possible translocation of this nanomaterial from the digestive tract to blood or from the lung to blood and then to other organs in the body must be considered. Inhaled ultrafine particles translocation has been previously described at low rate in a few studies with other particles like iridium or gold (Kreyling *et al.*, 2002 ; Takenaka *et al.*, 2006). Up to now, direct investigations of CNT translocation from the lung to the blood has not been conducted. The primary reason for that is the component structure of the CNT. Only made of carbon, CNT are difficult to distinguish from biological matrix. A few studies have used indirect methods to investigate CNT biokinetics (translocation, biodistribution, clearance...). Several biokinetics studies were performed by intra-venous injection of functionalized-CNT. Wang et al (2004) analyzed the biodistribution of SWCNT using a I_{125} -SWCNT construct, and revealed indirectly by radioactivity measurement of I_{125} , the presence of functionalized SWCNT in stomach, kidneys and bone. Similar observations were obtained in kidneys, liver and spleen by McDevitt et al (2007) with In_{111} -SWCNT. Functionalized SWCNT were found in the different organs, and biokinetics studies showed a rapid clearance of the In_{111} -SWCNT from blood and tissues (McDevitt *et al.*, 2007 ; Singh *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2004). One study followed the biokinetics of injected unmodified SWCNT using inherent near-infrared fluorescence of SWCNT for detection in blood and tissue samples (Cherukuri *et al.*, 2006). The authors report a rapid blood clearance and detected SWCNT only in the liver after 24h. These results suggest a possible difference in biokinetics between modified and unmodified CNT. To investigate unmodified MWCNT biokinetics, Muller et al (2005) used another method based on the quantification of the CNT production metal catalyst residue (Muller *et al.*, 2005). The production of carbon nanotubes by arc discharge (Iijima, 1991), laser ablation (Guo *et al.*, 1995) and chemical vapor deposition (Cassell *et al.*, 1999), use metal as catalysts such as iron,

nickel, cobalt, etc...which always remain as impurities in the final product (Pumera, 2007) and can be quantified. Here, we have first assessed the performances of using the metal catalyst of CNT as a tracer. We then analyzed unmodified Nickel-catalyzed MWCNT biokinetics after intratracheal instillation.

Results

Analysis of metal impurities: Results showed the presence of 0.53% (w/w) of Ni, 0.08% (w/w) of S, 0.02% (w/w) of Mg, less than 0.01% (w/w) of Na and V and less than 0.005% (w/w) each for all other metals tested (listed in materials and methods).

Analysis of Ni-CNT bonds in the lung and in the lymph nodes: STEM-EDX analysis of lungs and lymph nodes of MWCNT-exposed rats showed that peaks of Ni were observed only in the presence of MWCNT (Figure 1). The presence of Cu is due to the TEM grid used. Ni and Mg are impurities of MWCNT and additionally the last element is also normal constituent of cells. Multiple sections study of lung and lymph nodes revealed a perfect colocalization of CNT and Ni after STEM-EDX analysis (Figure 1). Ni was never detected in absence of CNT and vice-versa.

Biokinetics studies:

Biodistribution of MWCNT: To validate our Ni dosage method, suspensions with known final CNT quantity (0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μg) were produced in quadruplicate. The MWCNT impurity study showed that Ni was present at an average concentration of 0.53% (w/w) of total MWCNT mass. Thus, the theoretical final Ni quantities in the control suspensions are respectively 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25 and 0.5 μg . All prepared suspensions were mineralized and measured Ni quantities were determined by ICP-OES as it is described in materials and methods. No statistically significance differences between theoretical and measured Ni quantities were observed (data not shown) suggesting this dosage method is

relevant to determine and quantify Ni. The detection limit for this dosage was determined to be 0.5 µg/L of Ni and correspond in our experimental conditions to 100 µg/L of MWCNT.

No increases of Ni were detectable in organs after the 1 µg or 10 µg MWCNT exposures excepted in the lung at 10 µg of MWCNT (Figure 2). No Ni was detected at any time in liver, kidneys, spleen, heart, brain, thymus and testis of rats exposed to 1, 10 or 100 µg of MWCNT. Ni was detected in the lung of MWCNT-exposed rats throughout the experiment (from 1 to 180 days) and also detected in lymph nodes at day 30 (Figure 2). Considering that Ni represent 0.53% of MWCNT instilled, the percentage of MWCNT recovered was 63% at day 1, 78% at day 7, 97% at day 30, 38% at day 90 and 16% at day 180 (Table 1). Ni was not detected in BALF at any time post-exposure (Table 1).

About 50% of the instilled MWCNT were located in the parenchyma of the lung after 1 month. 10 to 24% of CNT were found in the alveolar cells during this period. At 30 days, 31% of total CNT injected was eliminated from the lung but 28% of this same nanotube was found in the lymph nodes for a transition period less than 60 days. Clearance of MWCNT was amplified at 3 and 6 months after the exposure because 63% and 84% of total MWCNT injected was respectively eliminated from the organism (Table 1).

Clearance of MWCNT from the lung: To investigate the clearance mechanism, alveolar cells isolated from BAL were counted with Malassez cell and observed by optical microscopy. Significant increases in cell number, respectively plus 44% and plus 100%, were noted at 7 and 180 days after treatment (Figure 3). Moreover, macrophages represented 98% of total cells, suggesting the important role of this cell type in the bioelimination of MWCNT from the lung. TEM observations of the lung and the lymph nodes sections have shown the presence of CNT agglomerates in vacuoles (endosomes) of macrophages in these 2 organs (Figure 4A and 4B). MWCNT were never observed in parenchyma or other cell types than alveolar macrophages in the lung or in the lymph nodes. To investigate the phagocytosis

capacity of lung cells, total RNA were extracted from the lung of CNT-exposed rats and specific mRNA of EEA1, an early endosome associated protein (Mu *et al.*, 1995 ; Wilson *et al.*, 2000) and mRNA of β actin, a cytoskeleton protein, were quantified by RT-PCR. Results have shown plus 50% induction of EEA1 mRNA at day 1 and day 180 with all doses of CNT (Figure 4C). For β actin, induction of mRNA was significantly noted with 10 μ g (plus 50% induction) and 100 μ g (plus 250% induction) of CNT at day 1 (Figure 4D). Separate quantification of macrophages containing MWCNT inside their cytoplasm and macrophages without MWCNT was performed at all times and doses. Results showed a MWCNT dose-dependant increase of the number of macrophages containing agglomerates of MWCNT at all times after the exposition (Figure 5). Analysis of biopersistence of MWCNT at 1 and 10 μ g, revealed a time dependent decrease of the cells number containing MWCNT agglomerates inside their cytoplasm. Nevertheless, increasing the dose of CNT induces an augmentation of the clearance time. When the rats were treated by 100 μ g of CNT, 45% of their alveolar macrophages contained CNT agglomerates one day after the treatment. This percentage increased at 7 days and 1 month to 55% and 63% respectively. Diminution of the number of phagocytosing cells was only noted at 3 and 6 month (Figure 5). For lower doses, the diminution of the number of phagocytosing cells was noted at 7 days for 10 μ g CNT and 1 days for 1 μ g CNT.

Physical and chemical modification of MWCNT in vivo:

Physical modification: MWCNT were instilled in rats and after 15 days, MWCNT lengths were compared to the control solutions by TEM. Results showed a modification of the structure (Figure 6A, 6B) and a significant diminution of MWCNT length suggesting the capacity of rat lung to cleave MWCNT (Figure 6C).

Chemical modification: After 15 days instillation of MWCNT in rat lung, chemical modifications of the MWCNT were assessed by infrared spectroscopy. Presence of alcohol,

carbonyl and nitrogen function were observed on the MWCNT instilled to rat but not on the same suspension of MWCNT that was not injected in the presence or absence of cells residue (Figure 6D). Our results suggest the capacity of rat lung to chemically modify the MWCNT structure.

Biological lung response to MWCNT:

Induction of a clearance enzyme: Observations of MWCNT in cells and quantification of MWCNT length at high magnification with TEM reveal the presence of cleaved fragments of MWCNT (Figure 6A and 7A). mRNA level of the cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and 2E1 (CYP2E1) were quantified. After 24h of exposure, the mRNA level of CYP1A1 was increased 2.2, 28 and 57 times in presence of respectively 1, 10 or 100 µg of MWCNT in comparison to untreated rats. 7 and 30 days after exposure, CYP1A1 mRNA was always induced 3 and 5 times in the presence of the 2 higher doses. At 90 and 180 days after the exposure, the mRNA level of CYP1A1 was only significantly induced 3 times in presence of 100 µg of MWCNT (Figure 7B). This induction was observed in pair with the increase of mRNA level of CYP2E1. In the presence of 1, 10 or 100 µg of MWCNT, mRNA level of CYP2E1 were 70, 60 and 123% at day 90 and were 40, 90 and 100% at day 180 respectively (Figure 7C).

Role of apoptosis in MWCNT clearance: In the lung, a fraction of cells seemed to be in apoptosis (Figure 8A) but free CNT were never found by TEM. Results have shown no modification of mRNA level for Elmo 3 protein (data not shown). But Elmo 1 protein mRNA was significantly induced 1.8, 2.7 and 5.1 times after 24h exposure for 1, 10 and 100 µg of CNT. At day 30 and day 90, mRNA expression level was significantly increased 2.5 times with 100 µg of CNT (Figure 8B). Similar variation of mRNA level of Elmo 2 was noted because the mRNA level was induced later 1.6, 2.7 and 3.1 times at d1 for 1, 10 and 100 µg of CNT. At d90, mRNA expression level was only significantly increased 3.8 times with 100 µg

of CNT (Figure 8C). Dock 180 mRNA was also induced 2.5 time 1, 30 and 180 days after the exposure (Figure 8D). Quantification of the expression of IL10 and GM-CSF which, are also involved in the engulfment of apoptotic cells, were performed. Inhibitions of 63% and 42% were noted for IL10 protein after 30 and 90 days respectively (Figure 9A). Concerning GM-CSF protein, significant inhibition was also observed 30 days after the exposure (Figure 9B).

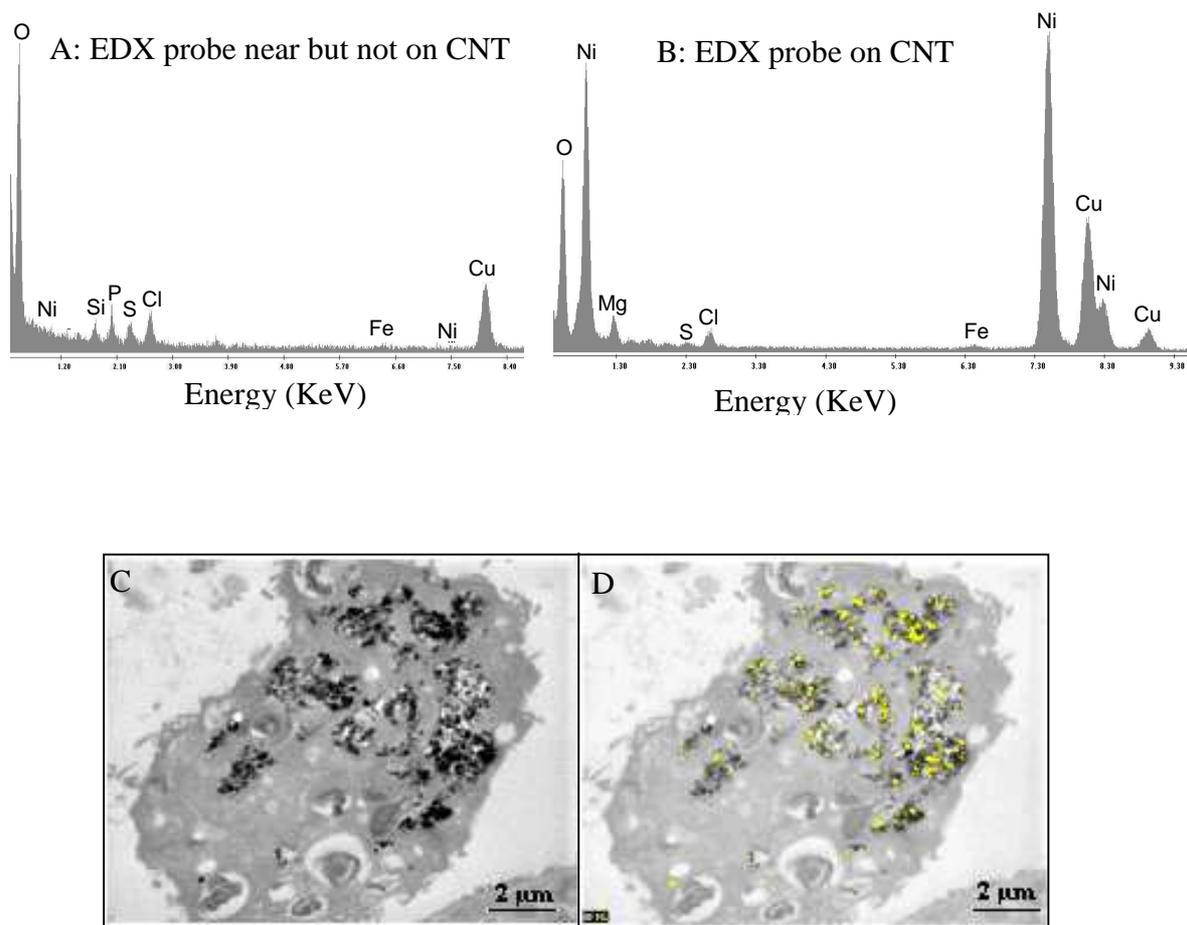


Figure 1: Analysis of Ni-CNT bonds in the lung and lymph nodes by STEM-EDX

Rats were instilled by 2 mg of MWCNT. STEM-EDX analysis was performed for Ni and MWCNT detection on ultrathin sections. Spectrum of Ni analysis by EDX probe was performed during 60s in absence (A) or in presence (B) of MWCNT agglomerates. To observe the localization of Ni and MWCNT agglomerates in organism, (C) TEM photo of

macrophage contains MWCNT agglomerates and (D) superposition of Ni position obtained with EDX probe (Resolution: 256x200; Dwell time: 800ms; Frames: 256) in the cells were performed and reveal that MWCNT is colocalized with Ni.

Table 1: Quantification of Ni in rat's organs after instillation of MWCNT by intratracheal instillation.

Groups of 6 rats were instilled by 100 µg of MWCNT and Ni was quantified by ICP-OES. Each value represents the mean ± SD of the percentage of Ni detected related to total Ni instilled (0.5 µg).

Treatment time (days)		1	7	30	90	180
L U N G	Lung after BAL	53 ± 12%	54 ± 10%	55 ± 8%	26 ± 6%	16 ± 9%
	Alveolar cells	10 ± 2%	24 ± 5%	14 ± 2%	12 ± 2%	-
	BALF	-	-	-	-	-
	Lymph nodes	-	-	28 ± 2%	-	-
	All other organs	-	-	-	-	-
	Total	63 %	78 %	97 %	38 %	16 %

- Non Detectable (<2% of MWCNT instilled).

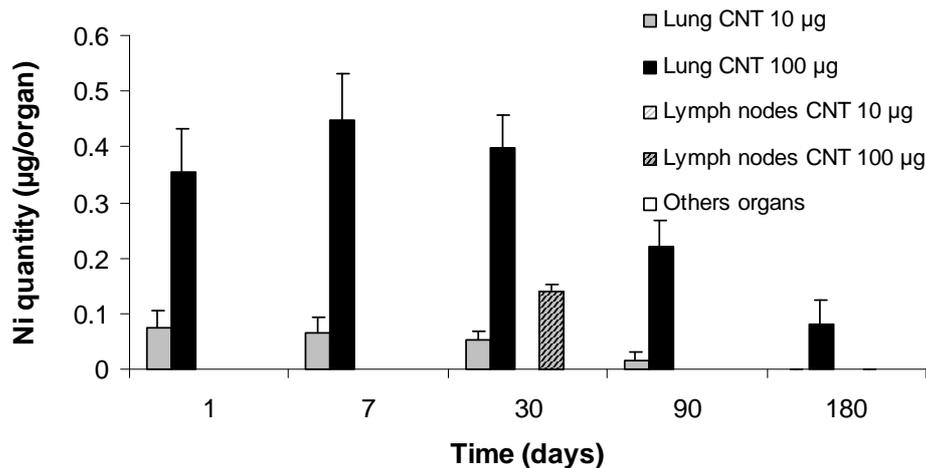


Figure 2: Biodistribution of MWCNT in organism

Presence of Ni was quantified in several organs. Representation of means \pm SD of Ni quantities present in 6 rat organs from 1 to 180 days after exposure at 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$. Results show that MWCNT doesn't cross lung barrier and is eliminated by a slow mechanism.

* Significantly different ($p < 0.05$) from no MWCNT control group.

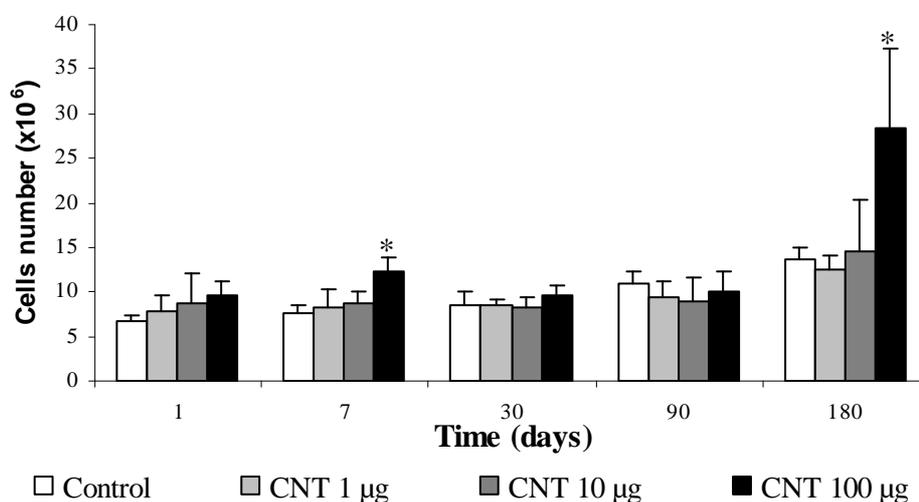


Figure 3: Effect of MWCNT on alveolar cell number and on phagocytosis cells.

Rats were treated by 1, 10 or 100 μg of CNT. After BAL at d1, d7, d30, d90 and d180, total cells were quantified. Results show a significant induction of cells at d7 and d180. Results are the mean of \pm SD obtained on 6 rats. * Significantly different ($p < 0.05$) from control group.

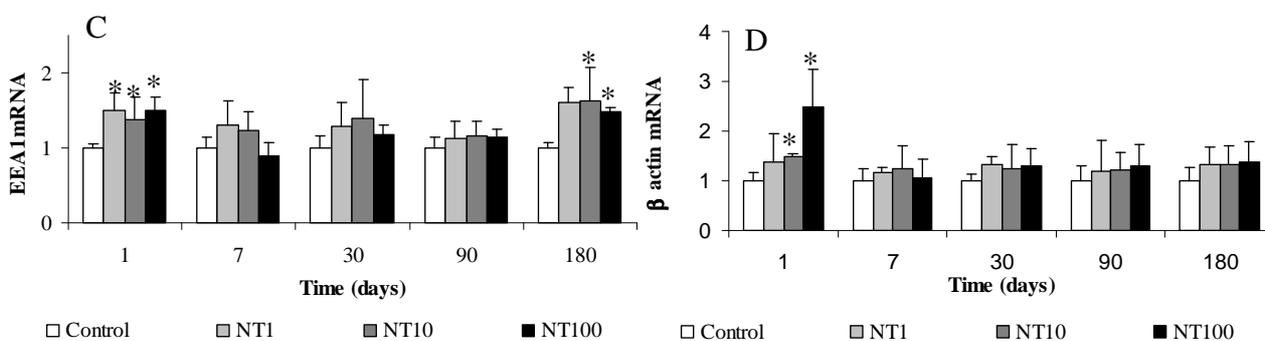
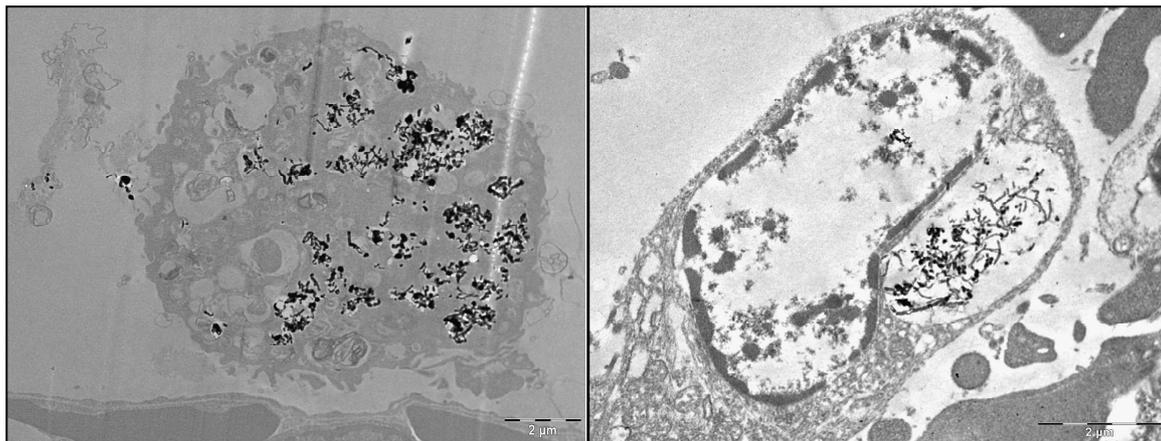


Figure 4: Phagocytosis of MWCNT *in vivo*

After instillation of 2 mg MWCNT, alveolar macrophage present in (A) lung and (B) lymph nodes sections were observed by TEM and reveal the presence of MWCNT agglomerates in macrophage vesicles. Quantification of (C) EEA1 mRNA and (D) actin beta mRNA normalized by RPL32 mRNA on the lung of rats treated by 1, 10 or 100 μg MWCNT support the MWCNT phagocytosis capacity of macrophages. Results are the mean of \pm SD obtained on 6 rats. * Significantly different ($p < 0.05$) from control group.

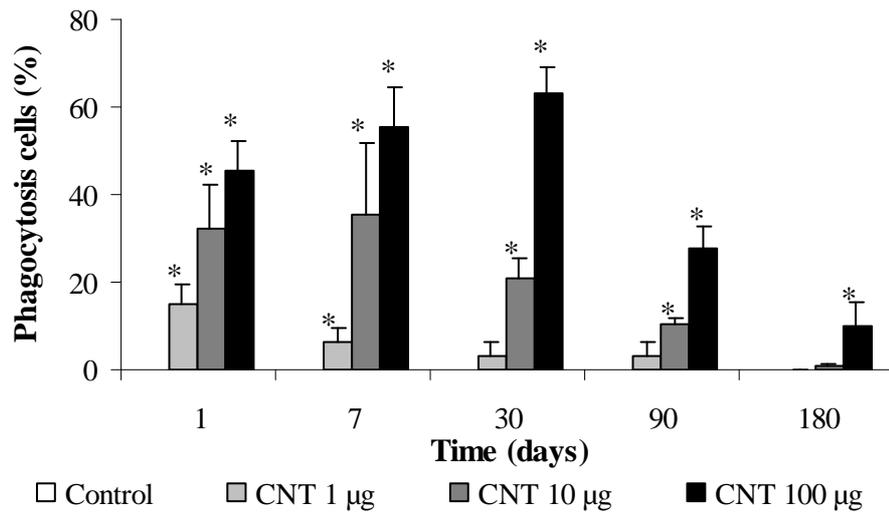


Figure 5: Effect of MWCNT on alveolar phagocytosis cells.

Rats were treated by 1, 10 or 100 µg of CNT. After BAL at d1, d7, d30, d90 and d180, percentage of phagocytosis cells were quantified. Results are the mean of \pm SD obtained on 6 rats. * Significantly different ($p < 0.05$) from control group.

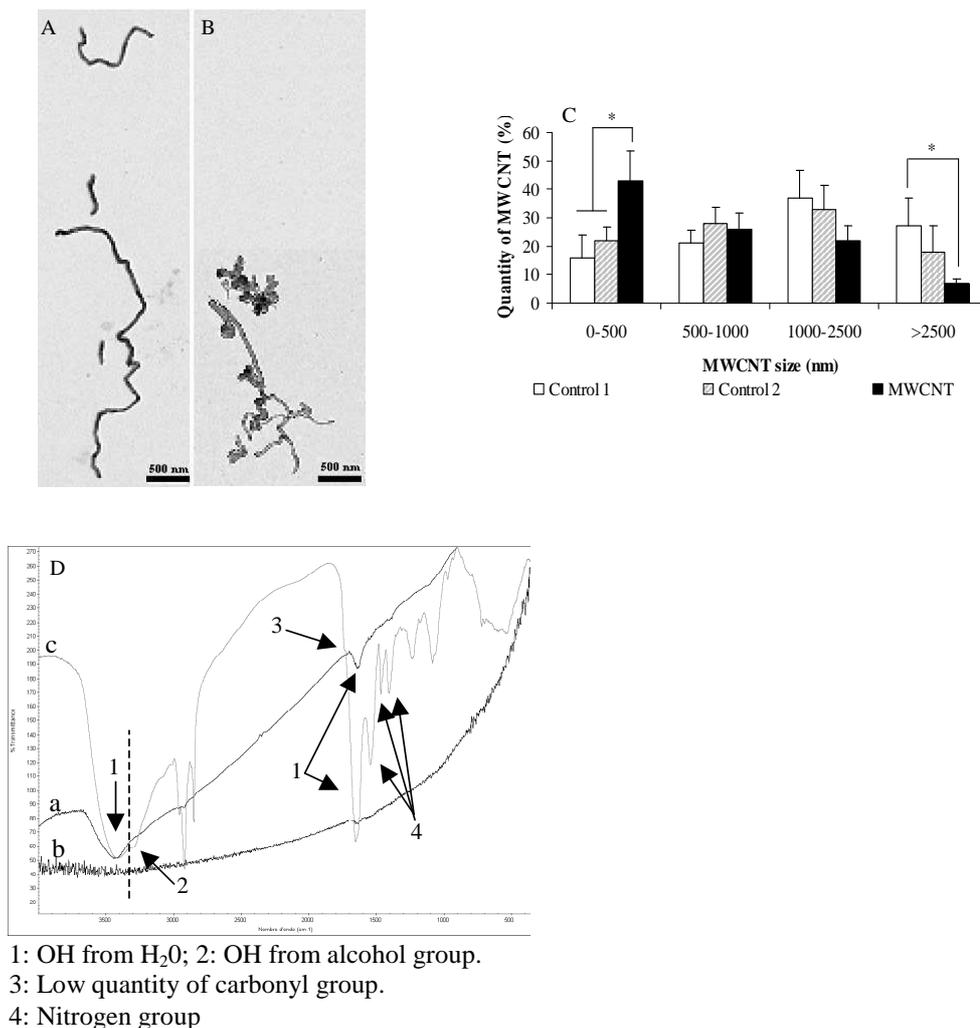


Figure 6: Physical and chemical modification of MWCNT *in vivo*:

Physical modifications of MWCNT were observed by TEM on (A) control 2 and (B) MWCNT after intratracheal instillation. (C) Length quantification of MWCNT length was performed at least on 100 MWCNT per condition (Control1, control 2 and MWCNT after intratracheal instillation). Results are the mean of \pm SD obtained on 3 independent experiment.

* Significantly different ($p < 0.05$) from control group.

(D) Chemical modifications of the MWCNT were assessed by infrared spectroscopy of (a) control 1, (b) control 2 and (c) MWCNT after intratracheal instillation. Spectra of a representative experiment performed on 3 rats.

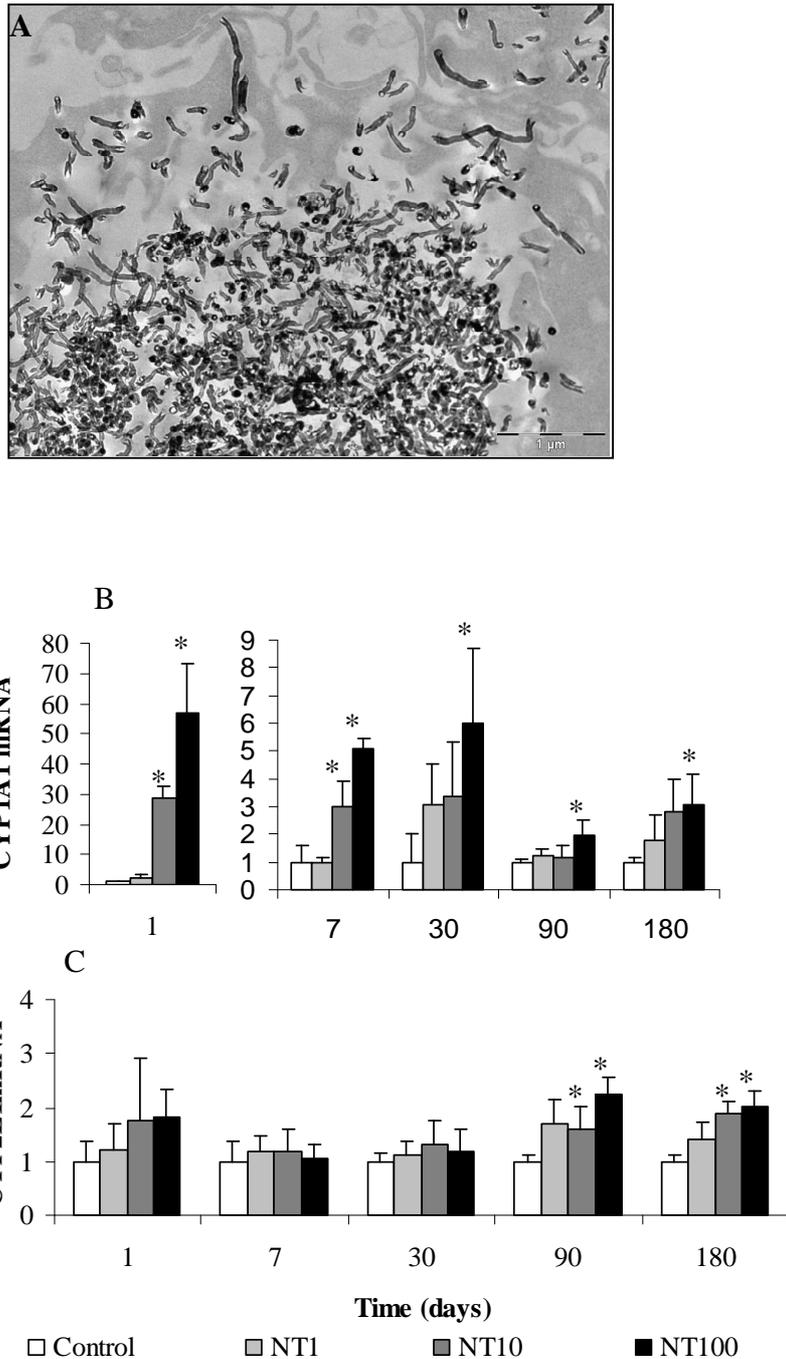


Figure 7: CYP1A1 and CYP2E1 mRNA were increased by MWCNT exposure

(A) Observation at high magnification of MWCNT in macrophages of rat treated by 2 mg, shows the presence of small fragments. In addition, induction of mRNA level of (C) CYP1A1 and (D) CYP2E1 normalized by RPL32 mRNA of rat treated by 1, 10 or 100 μg lets suppose MWCNT hydroxylase capacity of macrophages. Results are the mean of \pm SD obtained on 6 independent rats. * Significantly different ($p < 0.05$) from control group.

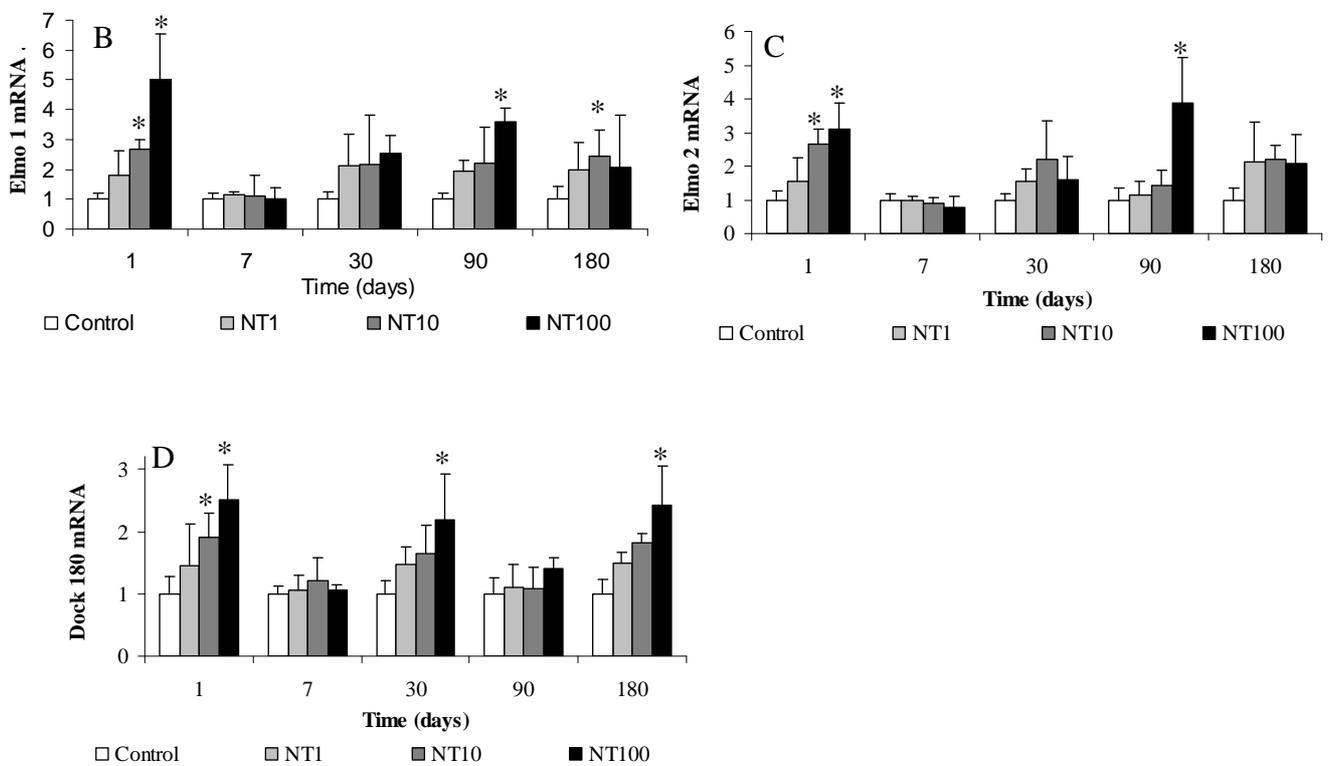
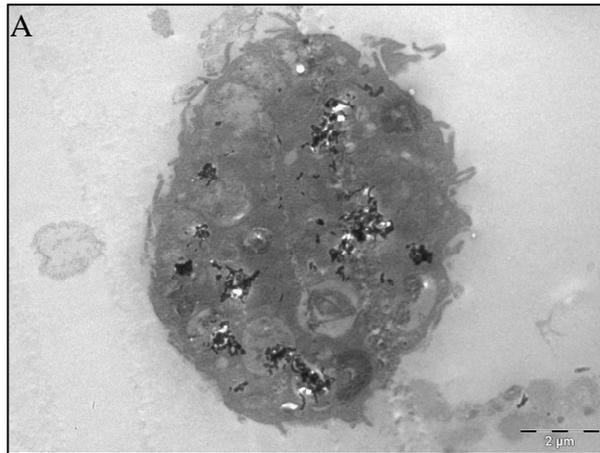


Figure 8: MWCNT could induce alveolar macrophage (AM) apoptosis and apoptotic cells may be engulfed by other AM.

TEM analysis of lung sections of rat instilled with 2 mg of MWCNT showed the presence of apoptotic macrophages. This observation is supporting by the quantification of mRNA of (B) Elmo 1, (C) Elmo 2 and (D) Dock 180 normalized by RPL32 mRNA suggesting the capacity

of macrophages to engulf apoptotic cells. Results are the mean of \pm SD obtained on 6 rats. * Significantly different ($p < 0.05$) from control group.

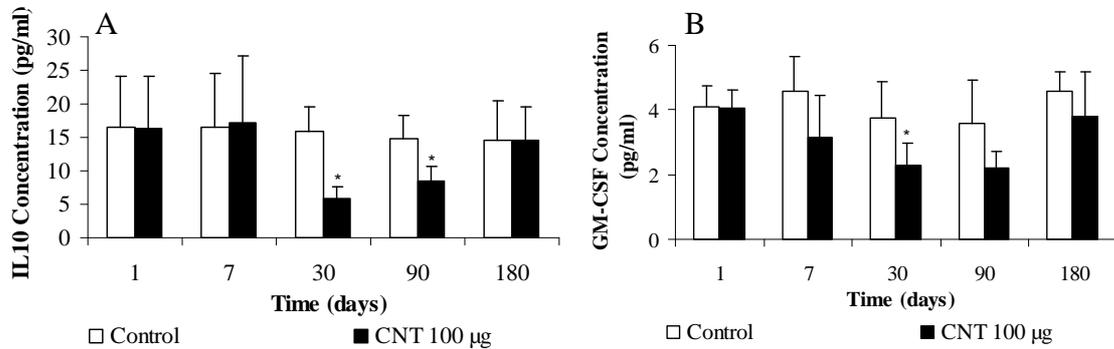


Figure 9: MWCNT could inhibit the expression of IL10 and GM-CSF protein.

Rats were instilled by 100 µg of CNT and quantification of (A) IL10 and (B) GM-CSF in BALF was performed by ELISA multiplex (Luminex) after 1, 7, 30, 90, 180 days. Results are the mean of \pm SD obtained on 6 rats. * Significantly different ($p < 0.05$) from control group.

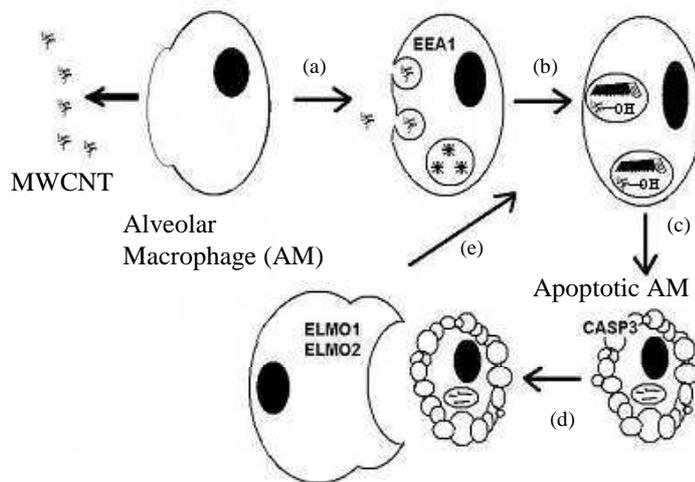


Figure 10: Proposition of clearance mechanism of MWCNT in the lung.

MWCNT could be engulfed by macrophages (a), hydroxylated by CYP1A1 and CYP2E1 and cleaved (b). After this step, some cells enter into apoptotic phase (c). Then, a new cell could engulf the apoptotic macrophages to continue the elimination (d). The last step will be repeated as necessary to eliminate totally the MWCNT from the lung (e).

Discussion

Previous studies on MWCNT biodistribution were performed after tracer attachment on the surface of the tubes. But tracers modify MWCNT hydrophobicity and therefore MWCNT biodistribution. STEM-EDX analysis of our MWCNT reveals that Ni, which is an intrinsic impurity of the MWCNT we used, is strongly linked to the MWCNT and that MWCNT-Ni bonds are not affected in the body. Our results show that Ni can be used as native MWCNT tracer. More generally, utilization of metallic impurities as tracers can be a good approach to assess biokinetics of MWCNT in the body. However, the detection limit (here 0.01 µg/ml of Ni) does not allow the utilization of this method for very low concentration of MWCNT. In addition, the strength of the bond between the metal and the MWCNT can be different, depending on metals and CNT types. So that STEM-EDX bonding analysis should be performed for each CNT studied.

Ni quantification in several organs has revealed the presence of MWCNT only in the lungs and in the lymph nodes. 30 days after the instillation of MWCNT, the totality of particles was found in the lung (69%) and in the lymph nodes (28%). These results suggest no, or at least a negligible, elimination or biodistribution of CNT to other organs 1 month after instillation. Such an observation has already been done. In their study, Muller et al (2005) had found no nearly elimination of MWCNT in the rat lung 28 days after an intratracheal instillation. In our experiment, the presence of Ni in the lymph nodes was only observed at 30 days. This result can be explained by the absence of quantification between 7 days and 30 days and between 30 days and 90 days. Ni and so CNT is certainly not present in the lymph nodes only 30 days after exposure but probably between more than 7 days and less than 90 days.

We have shown a decrease in the MWCNT quantity initially instilled 3 and 6 months after exposure. Three months after, only 37% of the MWCNT remained within the lungs and only 16% remained after 6 months. These observations are also in accordance with the results

obtained by Muller et al, where only 18% of intact instilled MWCNT was eliminated in the lung after 60 days (Muller *et al.*, 2005). The fact that we failed to detect MWCNT in various systemic organs is in favor of elimination rather than a translocation of MWCNT from the lungs. Nevertheless, due to the detection limit of our Ni dosage method, a very limited translocation (< 2% of MWCNT instilled) could not be ruled out. This absence of alveolar passage was also described *in vitro* on pulmonary barrier (Geys *et al.*, 2006). So, taken together, all these results show that MWCNT do not seem to significantly cross alveolar epithelial barrier and that they are eliminated from the lung by a slow mechanism.

The fact that the totality of instilled MWCNT was not detected at day 1 and day 7, (respectively 63% and 78%) is probably due to the experimental protocol. Indeed, MWCNT quantification in the BALF was performed after a centrifugation through a membrane as described in Materials and Methods section. At this step, free MWCNT that were present at 1 and 7 days were certainly eliminated and so was not quantified. This hypothesis is strengthened by the fact that difference observed between 1, 7 and 30 days is due to an augmentation of MWCNT in alveolar cells suggesting a diminution of free MWCNT part in the lung (Table 1).

Our study of MWCNT localization in the lung showed little modification of MWCNT quantity in the parenchyma, augmentation in alveolar cells (10% at day 1 and 24% at day 7) and absence in the BALF. In parallel, the observation of the alveolar cell population by optical microscopy reveals that the cells were mainly alveolar macrophages and that there was an increase in the phagocytosing cell number well correlated with the chemical dosage of MWCNT in the cellular part of the BALF. Engulfment of MWCNT by alveolar macrophages was also confirmed by TEM observations. This cell localization for MWCNT confirms the potential capacity of alveolar macrophages to phagocytose CNT as it was described before (Cherukuri *et al.*, 2004 ; Pulskamp *et al.*, 2007).

To reinforce that hypothesis, mRNA levels of EEA1 and beta actin, that are involved respectively in vesicles-endosome fusion (Wilson *et al.*, 2000) and in cytoskeleton, were quantified. 50% and 250% induction was observed for respectively EEA1 and β actin mRNA 1 day after exposure. At high magnification with TEM, cleaved fragments of MWCNT were quantified and observed in several cells. This result associated with the chemical modifications observed by infrared spectroscopy leads us to hypothesize that alveolar macrophages modify the MWCNT they have engulfed, in order to facilitate their further elimination from the lung. In parallel, very high increases of CYP1A1 for all times, and CYP2E1 at day 90 and day 180 mRNA were noted. These enzymes were described to hydroxylase carbon molecules as polycyclic aromatic hydrocarbons (Spatzenegger *et al.*, 2003). The delayed induction of CYP2E1 might be due to the fact that CYP2E1 can only act on small molecules (Spatzenegger *et al.*, 2003). So, a possible hypothesis is that hydroxylations of MWCNT by CYP might occur. Nevertheless, several macrophages that contain MWCNT seemed to be in apoptosis (figure 8A). This phenomena was previously described with MWCNT on primary culture of T lymphocytes and on T lymphocyte Jurkat cell line (Bottini *et al.*, 2006). The elimination of apoptotic cells need the activation of special mechanism that need the contribution of Elmo proteins to form a complex with DOCK180 to promote engulfment of apoptotic cells (Alibert et Chimini, 2002). This elimination was demonstrated to be in pair with the inhibition of IL10 and GM-CSF protein (Fadok *et al.*, 1998). Induction of mRNA level of Elmo 1, Elmo 2 and Dock 180 associated with the inhibition of IL10 and GM-CSF protein in the lung of rat expose by MWCNT is not a proof but is in favor of the presence of apoptotic cells that are eliminated by phagocytosis. Thus, we propose the following mechanism as hypothesis to explain the MWCNT elimination from the lung (see also figure 10): MWCNT agglomerates may be first engulfed by alveolar macrophage phagocytosis. After chemical modification and cleavage of CNT by CYP1A1,

CYP2E1 and maybe others enzyme that remain to be determined, cells enter in apoptosis. Then, another macrophages could phagocyte the apoptotic cells. To eliminate all CNT, these steps could be repeated as necessary as it is shown on Figure 10.

Conclusion

In summary, we have shown in this work that metallic impurities of CNT may be used as tracers for CNT pharmacokinetics and toxicological studies, insofar as we verified the impurities-CNT bonds. This approach reveals that the MWCNT we used don't significantly cross the pulmonary barrier and can be eliminated but with the activation of a slow mechanism. This elimination might to be due in part to macrophages throughout the activation of CYP1A1 and CYP2E1 that play an important role in the bioelimination of several carbonaceous xenobiotics. This hypothesis needs further investigations to be confirmed and to reach a better understanding of the fate of CNT in the body.

Materials and methods

Carbon nanotubes: MWCNT (product number: 636649) was purchased from Sigma -Aldrich (Lyon, France). These nanotubes were synthesized by Chemical Vapor Deposition method. Their diameter ranged from 20 to 50 nm and their length from 0.5 to 2 μm (data from the supplier).

Analysis of MWCNT metal impurities: MWCNT were mineralized in 5 ml nitric acid plus 5 ml chloridric acid at 180°C for 15 min in a microwave oven (MarsXpress, CEM, Matthews, NC). The mixture was filtrated and the volume was adjusted to 20 ml with distilled water. Samples were then analyzed for metal content (Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, S, K, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, Se, Br, Rd, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn,

Sb, Te, I, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th and U) by ICP-MS (Elan, 6100DRC, Perkin Elmer- Sciex).

Preparation of MWCNT suspensions: Different concentrations of MWCNT were suspended in NaCl in the presence of bovine serum albumin (BSA) at the same concentration as that of the MWCNT. The suspensions were sonicated 2 mn (5s pause every 10s) at 40W with an ultrasonic probe (sonicator ultrasonic processor XL 2020, Misonix incorporated) as previously described (Elgrabli *et al.*, 2007). Using this dispersion method, more than 80% of total agglomerates have a size smaller than 10 μm and correspond to breathable agglomerates (Elgrabli *et al.*, 2007).

Animals: Male Sprague-Dawley rats weighing 180–220 g were purchased from Charles River Laboratories (St Germain-sur-l'Arbresle, France). The rats were kept in a conventional animal facility and had access *ad libitum* to food and drink. The experimental protocol has been approved by the local ethical committee for animal research.

Transmission Electron Microscopy (TEM) and CNT-Nickel bond analysis by Scanning and Energy Dispersive X ray microanalysis (STEM-EDX): 2 rats were exposed to NaCl-BSA as control and 6 rats were exposed to 2 mg of MWCNT by intratracheal instillation. This high quantity was chosen in order to facilitate the detection of CNT in the lung for STEM analysis. After 7 days, the animals were anesthetized. The lungs and the lymph nodes were removed, cut in small sections and fixed with 2.5% glutaraldehyde. After a postfixation with 1% osmium tetroxide, the samples were dehydrated by ethanol and embedded in EPON 812 (TAAB). The ultrathin sections of 90 nm and 150 nm respectively for TEM and STEM-EDX analysis were obtained by an ultramicrotome (UCT, Leica), mounted on copper grids and stained with uranyl acetate and examined in a Tecnai G₂ Biotwin (FEI) electron microscope using an accelerating voltage of 100 kV. Several photographs of entire cells and of local detailed structures were taken, analysed and compared to NaCl-BSA control samples.

To analyze the bond of CNT and nickel in the body, STEM-EDX analyses were performed. The organ sections were prepared as described above for TEM, omitting the postfixation with osmium tetroxide to avoid an Os peak in the spectra. Unstained ultrathin sections were analysed with a dispersive X-ray microanalyser equipped with a Super Ultra Thin Window (SUTW) model SAPPHIR (EDAX), at 100 kV.

Intratracheal instillation studies: Rats were intratracheally instilled with 0, 1, 10 or 100 µg of MWCNT/rat and sacrificed 1, 7, 30, 90 and 180 days later. For each concentration and for each recovery period, 2 groups of 6 rats (group A and group B) were used. Nanotube suspensions were prepared as previously described (Elgrabli *et al.*, 2007). Broncho alveolar lavage (BAL) and chemical quantification of Ni were performed on rats included in the group A. Histopathology and molecular biology were assessed on rats included in the group B.

Nickel dosage by Inductively Coupled Plasma –Optical Emission Spectrometer (ICP-OES):

Control and exposed animals of group A were anesthetized and the lungs, liver, kidneys, spleen, heart, brain, lymph nodes, thymus and testis were removed for ICP-OES nickel assay. The lung was separated in 3 compartments: the broncho alveolar lavage fluid (BALF) for detection of free MWCNT, the cellular part of the BAL for analysis the part of MWCNT engulfed in cells and the parenchyma of the lung. The organs were mineralized in 3.5 ml of nitric acid and 1.5 ml of chloridric acid for 4h at 100°C and then treated with 1.5 ml of H₂O₂ for 1h at 95°C on a heat bloc. The volume was adjusted to 20 ml with distilled water and samples were analyzed for nickel content by ICP-OES (Ultima, HORIBA Jobin Yvon, Edison, NJ).

Alveolar cellularity: BAL was performed on anesthetized animals included in the group A. The lungs were washed 3-times with 9 ml of phosphate buffered saline (PBS). The BAL was centrifuged (5 min, 15wa0 g at 4°C) and the cell-free BAL (BALF) was concentrated using centrifugation (2000g, 4°C) in Amicon Ultra tubes[®] (Millipore) until the volume was reduced

to 1 ml. The cell number was determined by counting with a Malassez cell. Differential cell count was performed on May-Grünwald-Giemsa-stained slides. Specific protein quantifications were performed in the concentrated BALF using bio-plex kit for IL10, GM-CSF (Biorad, Cat n°: 171K11070) according to the manufacturer's instructions.

Physical and chemical modification of MWCNT analysis by TEM and infrared

spectroscopy: A 0.7 mg/ml suspension of MWCNT was produced as previously described. 150 µl of this suspension was instilled in 3 rats. After 15 days, rats were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbital and BAL were performed. A first centrifugation at 350g for 10 min was performed to separate the MWCNT and the cells from the protein fraction. Cells lysis was then done in the presence of 300 µl of distilled water. After 1h, 10 µl of this suspension was loaded on TEM copper grids to measure the length of MWCNT. In parallel, 2 types of control were realized. First control was prepared by loading directly 10 µl of the instilled suspension on TEM copper grid. For the second control, BAL was performed on untreated rats. Cells were recovered by a 350g centrifugation for 10 min. After removing the protein fraction, cells were lysed in the presence of water for 1h and the suspension was put in presence of 0.7 mg of CNT. After 15 days at 37°C in oven, the suspension was centrifuged at 350g for 10 min and resuspended in water at the same time of MWCNT instilled in rats. 10 µl of this suspension was loading on TEM copper grid as control 2.

Treated MWCNT, control 1 and control 2 suspensions were then centrifuged at 350g for 10 min. Supernatant was eliminated by pipeting and put at 37°C over night to obtain a dry powder. Chemical modification was then assessed by infrared spectroscopy (Nicolet 510M) on 70 µg of commercial MWCNT powder, control 1 powder, control 2 powder and treated MWCNT in the presence of 260µg of KBr.

Phagocytosis makers' and Cytochrome P450 analysis by reverse transcription real time polymerase chain reaction (RT-qPCR): 30 mg of lungs from group B rats was disrupted using Precellys[®] 24 lysis/homogenizer (Bertin technologies, France) and total RNA was extracted with RNeasy[®] plus Mini Kit according to manufacturer's protocol in presence of 600 µl of RLT buffer. 1 µg of total RNA was reverse transcribed to cDNA with Omniscript[®] Reverse Transcription kit (Qiagen, France) according to the manufacture's protocol using OligodT primer (Qiagen).

The quantification of mRNA for RPL32 (first housekeeping gene, Cat n° QT00444857), GNB2L1 (second housekeeping gene, Cat n° QT00193872), EEA1 (Cat n° QT01619121), β actin (Cat n° QT00193473), Elmo 1 (Cat n° QT01581930), Elmo 2 (Cat n° QT00365680), Elmo 3 (Cat n° QT00382214), Dock 180 (Cat n° QT01684081), CYP1A1 (Cat n° QT01082018), and CYP2E1 (Cat n° QTQT00180061) transcript were performed using QuantiTect[™] Primer[®] Assay (Qiagen) and QuantiTect[™] Sybr Green[®] Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocols on 100 ng of cDNA using Mastercycler[®] ep *realplex 4 S* (epENDORF, France). Each sample was run in triplicate.

Statistics

All data were expressed as mean ± S.D (standard deviation). Differences between groups were assessed by the one-way analysis of variance (ANOVA). If the variances between groups were homogenous, groups were subjected to the multiple comparison Dunnett's test. If the variances were not homogeneous, groups were compared by the Mann-Whitney test. *P < 0.05 was considered as the statistical significance level.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work has been supported by a grant of French Ministry for Ecology, Sustainable Development and Spatial Planning (MEDAD), BCRD05-DRC04 NANORIS TOXI (AP2005).

Jorge Boczkowski is supported by Inserm and Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (Contrat d'Interface)".

References

- Alibert M and Chimini G (2002). L'élimination des cellules apoptotiques: une phagocytose particulière. *Medecine/sciences* **18**, 853-860.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A and Mustelin T (2006). Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett* **160**, 2, 121-126.
- Cassell AM, Raymakers JA, Kong J and Dai H (1999). Large Scale CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Phys Chem B* **103**, 31, 6484-6492.
- Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH and Weisman RB (2004). Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells. *J Am Chem Soc* **126**, 48, 15638-15639.
- Cherukuri P, Gannon CJ, Leeuw TK, Schmidt HK, Smalley RE, Curley SA and Weisman RB (2006). Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 50, 18882-18886.
- Elgrabli D, Abella-Gallart S, Aguerre-Chariol O, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J and Lacroix G (2007). Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for *in vivo* and *in vitro* studies. *Nanotoxicology* **1**, 4, 266 - 278.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY and Henson PM (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**, 4, 890-898.
- Geys J, Coenegrachts L, Vercammen J, Engelborghs Y, Nemmar A, Nemery B and Hoet PH (2006). *In vitro* study of the pulmonary translocation of nanoparticles A preliminary study. *Toxicol Lett* **160**, 3, 218-226.
- Guo T, Nikolaev P, Thess A, Colbert DT and Smalley RE (1995). Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chemical Physics Letters* **243**, 1-2, 49-54.
- Iijima S (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 6348, 56-58.
- Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdorster G and Ziesenis A (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **65**, 20, 1513 - 1530.
- McDevitt MR, Chattopadhyay D, Kappel BJ, Jaggi JS, Schiffman SR, Antczak C, Njardarson JT, Brentjens R and Scheinberg DA (2007). Tumor Targeting with Antibody-Functionalized, Radiolabeled Carbon Nanotubes. *J Nucl Med* **48**, 7, 1180-1189.
- Mu F-T, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo J-P, Tock EPC and Toh B-H (1995). EEA1, an Early Endosome-Associated Protein. *J Biol Chem* **270**, 22, 13503-13511.
- Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier J-F, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB and Lison D (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**, 3, 221-231.
- Pulskamp K, Diabate S and Krug HF (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.

- Pumera M (2007). Carbon nanotubes contain residual metal catalyst nanoparticles even after washing with nitric acid at elevated temperature because these metal nanoparticles are sheathed by several graphene sheets. *Langmuir* **23**, 11, 6453-6458.
- Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, Bianco A and Kostarelos K (2006). Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9, 3357-3362.
- Spatzenegger M, Born SL and Halpert JR (2003). Cytochrome P450 in Laboratory Animal Species in Lee JS, Obach RS and Fisher MB (Eds), *Drug Metabolizing Enzymes*, Marcel Dekker, pp. 179-209.
- Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Müller W, Behnke-Semmler M, Jennen L, Walch A, Michalke B, Schramel P, Heyder J and Schulz H (2006). Distribution Pattern of Inhaled Ultrafine Gold Particles in the Rat Lung. *Inhalation Toxicology* **18**, 10, 733-740.
- Wang H, Wang J, Deng X, Sun H, Shi Z, Gu Z, Liu Y and Zhao Y (2004). Biodistribution of Carbon Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **4**, 1019-1024.
- Wilson JM, de Hoop M, Zorzi N, Toh BH, Dotti CG and Parton RG (2000). EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell* **11**, 8, 2657-2671.

4.3.3. Résumé de l'article

L'analyse de la pharmacocinétique des NTC non fonctionnalisés nécessite d'utiliser comme traceur un composant intrinsèque du NTC considéré, afin d'éviter toutes modifications structurales susceptibles d'agir sur sa toxicité. Les métaux catalysant la fabrication des NTC semblent être de bons candidats puisqu'une fraction résiduelle est toujours présente sur les NTC. Afin de le vérifier, nous avons instillé des rats par des MWCNT contenant 0,5% de Ni. 7 jours après traitement, l'analyse au MET couplé à une sonde EDX (Emission de photons X) de coupes de poumon et de ganglions lymphatiques de rats traités, révèle une parfaite colocalisation entre les MWCNT et le Ni. Ainsi, les résultats obtenus montrent que le Ni reste parfaitement fixé au NTC dans l'organisme et peut donc être utilisé comme traceur du MWCNT considéré lors d'études *in vivo*. Nous avons alors cherché à détecter la présence éventuelle de NTC dans de nombreux organes (foie, reins, rate, cœur, cerveau, poumon, testicules, ganglions lymphatiques et thymus) à divers temps suivant l'instillation. A l'exception des poumons et des ganglions lymphatiques, la présence de Ni, et donc de NTC, n'a pas été détectée dans d'autres organes après 1, 7, 30, 90 et 180 jours, suggérant ainsi l'incapacité des MWCNT à traverser de façon significative la barrière alvéolo-capillaire. De plus, il a été observé que la totalité du NTC instillé reste présente dans le poumon pendant au moins 1 mois après le traitement. Une diminution de 62% et de 84% de la quantité de NTC injectée est cependant observée à respectivement 3 mois et 6 mois. Les NTC n'ayant été retrouvés dans aucun autre organe que le poumon et les ganglions, il est possible de conclure en l'existence probable d'un mécanisme de clairance pulmonaire pour le NTC étudié.

Afin d'identifier ce mécanisme, nous avons cherché à mettre en évidence ses principales étapes. Pour ce faire, des rats ont été instillés par 1, 10 ou 100 µg de MWCNT et différents paramètres ont été analysés 1, 7, 30, 90 et 180 jours après traitement. Des coupes de poumon

ont ainsi été réalisées puis observées au MET. Suite à la quantification en PCR quantitative de l'ARNm de biomarqueurs du cytosquelette (β actine) et de la formation d'endosome précoce (EEA1), la capacité des macrophages alvéolaires à phagocyter les MWCNT a pu être démontrée. La question est donc de savoir quel est le devenir des MWCNT une fois phagocytés ? Pour répondre à cette question, l'analyse de la structure de MWCNT instillés dans des rats a été réalisée au MET et en spectroscopie infrarouge après 15 jours. Suite à ces expériences, une diminution de la taille des MWCNT ainsi que des modifications physiques et chimiques de la structure des NTC par fixation de groupements alcools et nitrés ont été notées. Par ailleurs, l'induction de l'ARNm d'enzymes impliquées dans la dégradation des xénobiotiques (cytochrome P450 1A1 et 2E1) a été mesurée. Ces enzymes, et plus particulièrement le cytochrome P450 1A1, sont connues pour jouer un rôle dans la fixation de groupements hydroxylés tel que les alcools afin de favoriser la solubilisation et l'élimination d'éléments étrangers. Elles pourraient donc intervenir dans la clairance des MWCNT.

Par ailleurs, et bien que la présence de cellules en apoptose ait également été notée, une induction de marqueurs de la phagocytose de cellules apoptotiques (Elmo 1, Elmo 2 et Dock 180) ainsi qu'une diminution de l'expression de cytokines proinflammatoires (IL-10 et GM-CSF), caractéristiques de ce phénomène, ont été notées. Ainsi nous posons ici l'hypothèse d'un mécanisme de clairance selon laquelle après phagocytose, les nanotubes sont modifiés physiquement et chimiquement. Les macrophages alvéolaires ayant joué leur rôle entrent alors en apoptose formant des débris cellulaires. Ces débris sont alors pris en charge par un nouveau pool de cellules afin de poursuivre l'élimination des MWCNT présents dans le poumon.

Ce mécanisme permet, d'une part d'expliquer la longue clairance pulmonaire des MWCNT, et d'autre part de tenir compte de l'ensemble des observations effectuées et plus précisément de l'absence de processus inflammatoire. Ces résultats ayant été obtenus suite à une

exposition unique, nous pouvons donc nous demander quelle serait la réaction de l'organisme face à une exposition répétée.

5. Bilan et Conclusion générale

5.1 La démarche méthodologique

Les nanotechnologies font l'objet de nombreux articles de presse, débats publics et émissions télévisées montrant l'inquiétude suscitée par le grand public face à ces technologies du futur tant sur le plan toxicologique qu'environnemental. Parmi les particules destinées à être utilisées dans l'industrie et donc susceptibles à terme de se retrouver au contact du grand public, on distingue entre autres les nanotubes de carbone (NTC). C'est pourquoi, au cours de ce travail, nous avons décidé d'étudier la toxicité de cette particule et plus précisément d'un NTC multi-feuillet (MWCNT). En raison de leur faible taille, les NTC sont très facilement mis en suspension faisant de l'appareil respiratoire une voie d'entrée principale dans l'organisme. Pour réaliser cette étude, deux grands types d'expositions pouvaient être envisagés : l'instillation intratrachéale (IT) ou l'inhalation. L'inhalation est une méthode d'exposition plus physiologique et représentative de la réalité environnementale car elle ne nécessite pas d'anesthésie et permet aux barrières des voies aériennes supérieures de jouer leur rôle de rétention et d'épuration. Cependant, la mise au point d'une telle méthode nécessite la production et la vaporisation d'un aérosol contenant des agglomérats de particules de taille respirable (inférieure à 10 μm). De plus, l'évaluation de l'exposition réelle des animaux est difficile. Lors d'un traitement par IT, l'inconvénient majeur est de court-circuiter le processus complexe de l'inhalation physiologique c'est à dire du dépôt, de l'épuration et de la rétention des particules au niveau des voies aériennes supérieures. L'ensemble des particules instillées vont alors se retrouver au niveau du poumon profond. L'avantage est que la concentration réelle en particule au niveau du poumon est connue bien que certaines particules ne devraient sans doute pas pénétrer aussi profond dans l'appareil respiratoire lors du processus normal de respiration. Pour limiter ce problème et mimer la réalité

physiologique, il est donc nécessaire de produire une suspension de particules dont la taille des agglomérats correspond à celle normalement présente au niveau du poumon profond (inférieur à 10 μm). En dépit de cela, cette méthode présente l'avantage de permettre l'analyse des effets toxiques induits par la particule étudiée dans l'hypothèse où elle passerait les barrières formées par les voies aériennes supérieures et se retrouverait dans le poumon profond. Par conséquent, ces deux techniques sont complémentaires lors de l'étude de la toxicité d'une particule. Les NTC étant relativement récents sur le marché, il est donc nécessaire d'obtenir des réponses rapides sur leur toxicité et notamment d'identifier les potentialités inflammatoires, fibrosantes, ou de passage alvéolo-capillaire. C'est pour cela que nous avons choisi, lors de ce travail, de mettre au point une méthode de dispersion des NTC compatible avec le milieu biologique, capable de produire des agglomérats de particules dont la taille peut physiologiquement atteindre le poumon profond. Ainsi, l'étude de la toxicité pulmonaire et du passage de la barrière alvéolo-capillaire suite à une IT a pu être menée. Comme nous l'avons montré, l'utilisation d'albumine en tant qu'agent dispersant semble être la mieux indiquée car cette protéine est naturellement présente dans le surfactant pulmonaire et permet la production d'une suspension contenant des agglomérats de taille respirable.

5.2 La toxicité des nanotubes de carbone

Les études traitant de la toxicité des NTC suite à une IT ont mis en évidence l'induction de biomarqueurs de l'inflammation, des altérations histopathologiques du poumon (granulomes et fibrose) ainsi qu'un stress oxydant. Cependant, ces effets n'ont pas été retrouvés lors d'expérimentations par inhalation ou lors de nos travaux suite à l'instillation de NTC dispersés par de la BSA. Une première hypothèse serait que la BSA inhibe les effets induits par les NTC au niveau pulmonaire. Les travaux de Dutta et al. (2007), montrant que les NTC interagissent préférentiellement avec l'albumine dans le plasma, vont dans le sens de cette

hypothèse. Néanmoins, sachant que la quantité de BSA utilisée pour disperser les NTC est 100 fois inférieure à la quantité d'albumine naturellement présente dans le poumon, on peut considérer que l'inhibition de l'effet des NTC susceptible d'être induite par la BSA ajoutée est négligeable. Une autre explication plausible serait que les effets pathologiques observés (inflammation, granulomes, fibrose...) pourraient être liés à l'instillation de gros agglomérats qui physiologiquement sont bloqués au niveau des voies aériennes supérieures. Leur présence anormale dans le poumon profond pourrait donc être à l'origine des phénomènes délétères décrits.

Etant donné que la mise au point de notre méthode de dispersion a également été l'occasion de constater que le nombre d'agglomérats phagocytés était inversement proportionnel à leur taille, et que ce phénomène s'accompagnait de l'absence d'inflammation, de stress oxydant et d'altérations histopathologiques, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les NTC de taille respirable pouvaient être éliminés via un mécanisme de clairance pulmonaire. Afin de réaliser une étude pharmacocinétique, il était nécessaire d'identifier puis d'utiliser un traceur. Or, l'ajout de traceur à la surface des NTC peut entraîner une modification de leur toxicité mais aussi de leur pharmacocinétique. Par conséquent, l'utilisation des catalyseurs métalliques naturellement présents sur les NTC s'est révélée être la solution la plus appropriée. Les résultats obtenus ont permis de confirmer que les NTC pouvaient être éliminés au niveau du poumon par un long mécanisme (100 µg éliminés en plus de 6 mois) sans passer la barrière alvéolaire et qu'ils subissaient des modifications physiques et chimiques. Plusieurs enzymes sont connues pour leur rôle dans la modification physico-chimique de xénobiotiques et en particulier le CYP1A1 dans la modification de molécules carbonées telles que les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP). Cependant, ces modifications sont également connues pour induire la formation d'adduits à l'ADN responsables des processus cancérogènes. Ainsi, l'identification des modifications chimiques des NTC couplées à

l'induction du CYP1A1 suite au traitement des MWCNT permettrait peut-être de mieux comprendre les potentiels effets carcinogènes décrits dans la littérature. Il semble également évident que le CYP1A1 ne peut à lui seul être responsable de l'ensemble des modifications chimiques induites aux NTC dans le poumon. Nous avons montré que les NTC étaient phagocytés au niveau des macrophages alvéolaires et qu'ils étaient présents dans des vacuoles cytoplasmiques. Ces vacuoles ont la capacité de fusionner avec des lysosomes qui contiennent un grand nombre d'enzymes dont certaines interviennent probablement dans les modifications chimiques et la clairance des NTC.

Associées à ces observations, l'apoptose et la phagocytose de cellules apoptotiques ont été mises en évidence. Ces phénomènes physiologiques sont décrits en l'absence d'inflammation et de stress oxydant (Alibert et Chimini, 2002). Ainsi, le mécanisme de clairance, reposant sur l'entrée en apoptose des macrophages ayant phagocyté et partiellement digéré les NTC ainsi que sur la phagocytose des cellules en apoptose, est en adéquation avec l'absence d'inflammation et de stress oxydant décrits lors de nos expériences et des expériences d'inhalation. Ces résultats sont également un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse selon laquelle les gros agglomérats de NTC présents de façon anormale au niveau du poumon profond pourraient être à l'origine des effets délétères décrits.

5.3 Perspectives

En perspective, il serait donc intéressant de mieux comprendre le mécanisme de clairance des NTC. Pour ce faire, il faudrait mettre en évidence les récepteurs capables de conduire à la phagocytose de ces particules et d'identifier les enzymes et le mécanisme conduisant au clivage des NTC. Plus particulièrement, il faudrait aussi étudier le rôle éventuel des CYP1A1 et 2E1 afin de définir précisément les intermédiaires chimiques conduisant à leur élimination.

Une fois ces intermédiaires identifiés, la présence éventuelle de molécules potentiellement cancérigènes pourrait être recherchée.

Par ailleurs, une meilleure connaissance de la voie d'activation de l'apoptose et de la phagocytose des cellules apoptotiques des macrophages alvéolaires suite au traitement par les NTC, pourrait permettre d'envisager une meilleure gestion de leur utilisation en tant que vecteur de médicament.

Enfin, la mise en place d'un modèle *in vitro* de barrière pulmonaire, afin d'étudier la toxicité et le passage des NTC, permettrait une approche plus ciblée des mécanismes impliqués et va dans le sens de l'éthique et de la réglementation Reach qui préconisent une limitation de l'utilisation des animaux de laboratoire.

Suite à ces expérimentations, il est possible d'espérer avoir une meilleure compréhension des résultats contradictoires observés lors des études par IT et inhalation, d'identifier les éventuels effets à long terme des NTC au niveau pulmonaire et notamment les effets cancérigènes afin de déterminer des seuils d'exposition pour les travailleurs et la population mais aussi pour leur utilisation médicale.

6. Références

- Ajayan PM and Lijima S (1992). Smallest carbon nanotube. **358**, 6381, 23.
- Alibert M and Chimini G (2002). L'élimination des cellules apoptotiques: une phagocytose particulière. *Medecine/sciences* **18**, 853-860.
- Allen DG, Riviere JE and Monteiro-Riviere NA (2001). Cytokine induction as a measure of cutaneous toxicity in primary and immortalized porcine keratinocytes exposed to jet fuels, and their relationship to normal human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters* **119**, 3, 209-217.
- Bair WJ, Bailey MR, Cross FT, Cuddihy RG, Gehr P, James AC, Johnson JR, Masse R, Roy M and Stahlhofen W (2004). Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. *International Commission on Radiological Protection* **24**, 4, ICRP Publication 66.
- Boczkowski J and Lanone S (2007). Potential uses of carbon nanotubes in the medical field: how worried should patients be? *Nanomed* **2**, 4, 407-410.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A and Mustelin T (2006). Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett* **160**, 2, 121-126.
- Brozdnicenko A, Ponomarev A, Pronin V and Rybalko V (2007). Magnetic properties of multiwall carbon nanotubes and astralenes in strong electric fields. *Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques* **1**, 1, 110-112.
- Cassell AM, Raymakers JA, Kong J and Dai H (1999). Large Scale CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Phys Chem B* **103**, 31, 6484-6492.
- Chan TL, Lee PS and Hering WE (1981). Deposition and clearance of inhaled diesel exhaust particles in the respiratory tract of fischer rats. *Journal of Applied Toxicology* **1**, 2, 77-82.
- Chen RJ, Bangsaruntip S, Drouvalakis KA, Wong Shi Kam N, Shim M, Li Y, Kim W, Utz PJ and Dai H (2003). Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *PNAS* **100**, 9, 4984-4989.
- Cheng HM, Li F, Su G, Pan HY, He LL, Sun X and Dresselhaus MS (1998). Large-scale and low-cost synthesis of single-walled carbon nanotubes by the catalytic pyrolysis of hydrocarbons. *Applied Physics Letters* **72**, 25, 3282-3284.
- Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH and Weisman RB (2004). Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells. *J Am Chem Soc* **126**, 48, 15638-15639.
- Cherukuri P, Gannon CJ, Leeuw TK, Schmidt HK, Smalley RE, Curley SA and Weisman RB (2006). Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 50, 18882-18886.
- CIPR (1994). Transfert à partir de la voie respiratoire (inhalation). <http://www-carminceafr/>.
- Comité français de la prévention et de la précaution (2006). Nanotechnologie, Nanoparticules : Quels dangers ? Quels risques ?
<http://lesrapportsladocumentationfrancaise.fr/BRP/074000286/0000pdf>.
- Cottrell RC, Foster JR, Pelling D, Herod IA, Lee VS, Purchase R, Bayley D and Miller K (1984). The Clara cell and pulmonary surfactant: a study using selective chemical ablation. *Cell Biochem Funct* **2**, 4, 201-207.
- Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdorster G, Utell MJ and Frampton MW (2003). Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal Toxicol* **15**, 6, 539-552.

- Davoren M, Herzog E, Casey A, Cottineau B, Chambers G, Byrne HJ and Lyng FM (2007). In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro* **21**, 3, 438-448.
- Donaldson K and Tran CL (2002). Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol* **14**, 1, 5-27.
- Dresselhaus MS, Dresselhaus G and Eklund PC (1996). Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes. *Book*, p.756.
- Dutta D, Sundaram S, Teegarden JG, Riley BJ, Fifield LS, Jacobs JM, Addleman SR, Kaysen GA, Moudgil BM and Weber TJ (2007). Adsorbed Proteins Influence the Biological Activity and Molecular Targeting of Nanomaterials. *Toxicol Sci* **19**, 19.
- Elgrabli D, Abella-Gallart S, Aguerre-Chariol O, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J and Lacroix G (2007). Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for in vivo and in vitro studies. *Nanotoxicology* **1**, 4, 266 - 278.
- Endo M (2002). Morinobu Endo interview. *Société Française de Chimie* http://www.sfc.fr/material/hrst.mit.edu/hrs/materials/public/Endo/Endo_interview_wpi_x.htm.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY and Henson PM (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**, 4, 890-898.
- Gambhir SS (2008). Toxicity of liver and spleen induced by carbon nanotube. Pilote experiment. <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=5398.php>.
- German Federal Institute for Risk Assessment (2006). Magic Nano" Product Recall Update. <http://nanotechwire.com/newsasp?nid=3178>.
- Geys J, Coenegrachts L, Vercammen J, Engelborghs Y, Nemmar A, Nemery B and Hoet PH (2006). In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles A preliminary study. *Toxicol Lett* **160**, 3, 218-226.
- Guo T, Nikolaev P, Thess A, Colbert DT and Smalley RE (1995). Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chemical Physics Letters* **243**, 1-2, 49-54.
- Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG and Gelfand EW (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 3 Pt 1, 766-775.
- Heyd R, Charlier A and McRae E (1997). Uniaxial-stress effects on the electronic properties of carbon nanotubes. *Phys Rev B* **55**, 11, 6820 LP - 6824.
- Hirsch A (2002). Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 11, 1853-1859.
- Iijima S (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 6348, 56-58.
- Iijima S and Ichihashi T (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **363**, 6430, 603-605.
- Journet C, Maser WK, Bernier P, Loiseau A, de la Chapelle ML, Lefrant S, Deniard P, Lee R and Fischer JE (1997). Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. **388**, 6644, 756-758.
- Kaczmarek M, Timofeeva OA, Karaczyn A, Malyguine A, Kasprzak KS and Salnikow K (2007). The role of ascorbate in the modulation of HIF-1[alpha] protein and HIF-dependent transcription by chromium(VI) and nickel(II). *Free Radical Biology and Medicine* **42**, 8, 1246-1257.
- Kam NWS, O'Connell M, Wisdom JA and Dai H (2005). Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 33, 11600-11605.

- Kelly FJ (2003). Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* **60**, 8, 612-616.
- Kierszenbaum AL (2006). Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique, De Boeck edn. De Boeck University.
- Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdorster G and Ziesenis A (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **65**, 20, 1513 - 1530.
- Lam CW, James JT, McCluskey R and Hunter RL (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* **77**, 1, 126-134. Epub 2003 Sep 2026.
- Lee PS, Chan TL and Hering WE (1983). Long-term clearance of inhaled diesel exhaust particles in rodents. *J Toxicol Environ Health* **12**, 4-6, 801-813.
- Li JG, Li W-X, Xu J-Y, Cai X-Q, Liu R-L, Li Y-J, Zhao Q-F and Li Q-N (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.
- Lu JP (1997). Elastic Properties of Carbon Nanotubes and Nanoropes. *Phys Rev Lett* **71** - *PRL* **79**, 7, 1297 LP - 1300.
- Mangum JB, Turpin EA, Antao-Menezes A, Cesta MF, Bermudez E and Bonner JC (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.
- Maraninchi D and Grimfeld A (2008). Grenelle de l'environnement - Rapport du Groupe III - Instaurer un environnement respectueux de la santé. http://www.legrenelle-environnement.fr/grenelle-environnement/IMG/pdf/G3_Synthese_Rapport.pdf.
- McCellan RO, Brooks AL, Cuddihy RG, Jones RK, Mauderly JL and Wolff RK (1982). Inhalation toxicology of diesel exhaust particles. toxicological effects of emissions from diesel engines. *Elsevier Science publishing*, 99-120.
- McDevitt MR, Chattopadhyay D, Kappel BJ, Jaggi JS, Schiffman SR, Antczak C, Njardarson JT, Brentjens R and Scheinberg DA (2007). Tumor Targeting with Antibody-Functionalized, Radiolabeled Carbon Nanotubes. *J Nucl Med* **48**, 7, 1180-1189.
- Mercer RR, Scabilloni J, Wang L, Kisin E, Murray AR, Schwegler-Berry D, Shvedova AA and Castranova V (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.
- Mercer RR, Scabilloni JF, Wang L, Schwegler Berry D, Shvedova AA and Castranova V (2007). Dispersion significantly enhances the pulmonary toxicity of single walled carbon nanotubes. *Toxicologist* **96**, 1, 231.
- Mitchell LA, Gao J, Vander Wal R, Gigliotti A, Burchiel SW and McDonald JD (2007). Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes. *Toxicol Sci* **28**, 28.
- Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY and Riviere JE (2005). Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett* **155**, 3, 377-384.
- Mu F-T, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo J-P, Tock EPC and Toh B-H (1995). EEA1, an Early Endosome-Associated Protein. *J Biol Chem* **270**, 22, 13503-13511.

- Muller J, Decordier I, Hoet PH, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Lison D and Kirsch-Volders M (2008). Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* **29**, 2, 427-433.
- Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier J-F, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB and Lison D (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**, 3, 221-231.
- Nanotechnologies-project (2007). <http://www.nanotechproject.org/inventories/>.
- Oberdörster G (2008). Interview with Dr. Günter Oberdörster. **International council on nanotechnology**. http://iconriceedu/centersandinst/icon/resourcescfm?doc_id=12301
- Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H and Group ArftIRFRSINTSW (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* **2**, 1, 8.
- Odom TW, Huang J-L, Kim P and Lieber CM (1998). Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes. **391**, 6662, 62-64. Office québécois de la langue française (2008). nanoparticule.
- Pacurari M, Yin XJ, Ding M, Leonard SS, Schwegler-berry D, Ducatman BS, Chirila M, Endo M, Castranova V and Vallyathan V (2008). Oxidative and molecular interactions of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) in normal and malignant human mesothelial cells. *Nanotoxicology* **2**, 3, 155 - 170.
- Pantarotto D, Briand JP, Prato M and Bianco A (2004). Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)*, 1, 16-17.
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WAH, Seaton A, Stone V, Brown S, MacNee W and Donaldson K (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **3**, 7, 423-428.
- Pulskamp K, Diabate S and Krug HF (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.
- Pumera M (2007). Carbon nanotubes contain residual metal catalyst nanoparticles even after washing with nitric acid at elevated temperature because these metal nanoparticles are sheathed by several graphene sheets. *Langmuir* **23**, 11, 6453-6458.
- Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, Akimoto Y, Ogino S, Nodasaka Y, Kohgo T, Tamura K, Akasaka T, Uo M, Motomiya K, Jeyadevan B, Ishiguro M, Hatakeyama R, Watari F and Tohji K (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. .
- Service. R (2004). Nanotechnology grows up. *science* **304**, 1732-1734.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A and Baron P (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A* **66**, 20, 1909-1926.
- Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, Johnson VJ, Gorelik O, Arepalli S, Hubbs AF, Mercer RR, Keohavong P, Sussman N, Jin J, Yin J, Stone S, Chen BT, Deye G, Maynard A, Castranova V, Baron PA and Kagan VE (2008). Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, 4, L552-565.
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V and Baron P (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.
- Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, Bianco A and Kostarelos K (2006). Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9, 3357-3362.
- Spatzenegger M, Born SL and Halpert JR (2003). Cytochrome P450 in Laboratory Animal Species in Lee JS, Obach RS and Fisher MB (Eds), *Drug Metabolizing Enzymes*, Marcel Dekker, pp. 179-209.
- Takagi A, Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S., Kanno, J., (2008). Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci*, 33(31):105-116.
- Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Müller W, Behnke-Semmler M, Jennen L, Walch A, Michalke B, Schramel P, Heyder J and Schulz H (2006). Distribution Pattern of Inhaled Ultrafine Gold Particles in the Rat Lung. *Inhalation Toxicology* **18**, 10, 733-740.
- Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD and Donaldson K (2000). Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence Of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal Toxicol* **12**, 12, 1113-1126.
- UK Department of Trade and Industry and British Standards Institution (2005). PAS 71. <http://www.bsi-global.com/en/Standards-and-Publications/Industry-Sectors/Nanotechnologies/PAS-71/>.
- Wang H, Wang J, Deng X, Sun H, Shi Z, Gu Z, Liu Y and Zhao Y (2004). Biodistribution of Carbon Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **4**, 1019-1024.
- Warheit DB (2004). Nanoparticles: Health impacts? *Materials Today* **7**, 2, 32-35.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA and Webb TR (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* **77**, 1, 117-125.
- Wick P, Manser P, Limbach LK, Dettlaff-Weglikowska U, Krumeich F, Roth S, Stark WJ and Bruinink A (2007). The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett* **168**, 2, 121-131.
- Wilson JM, de Hoop M, Zorzi N, Toh BH, Dotti CG and Parton RG (2000). EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell* **11**, 8, 2657-2671.
- Xu GB and Yu CP (1987). Deposition of Diesel Exhaust Particles in Mammalian Lungs A Comparison Between Rodents and Man. *Aerosol Science and Technology* **7**, 1, 117 - 123.
- Yakobson BI and Smalley RE (1998). New materials for the third millennium. *La Recherche* **307**, 50-56.
- Yang Z-P, Ci L, Bur JA, Lin S-Y and Ajayan PM (2008). Experimental Observation of an Extremely Dark Material Made By a Low-Density Nanotube Array. *Nano Lett* **8**, 2, 446-451.
- Yokoyama A, Sato Y, Nodasaka Y, Yamamoto S, Kawasaki T, Shindoh M, Kohgo T, Akasaka T, Uo M, Watari F and Tohji K (2005). Biological Behavior of Hat-Stacked Carbon Nanofibers in the Subcutaneous Tissue in Rats. *Nano Lett* **5**, 1, 157-161.
- Zhang LW, Zeng L, Barron AR and Monteiro-Riviere NA (2007). Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes. *Int J Toxicol* **26**, 2, 103-113.

Résumé

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

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

Abstract

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

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