



HAL
open science

Toxicité in vitro et propriétés physico-chimiques de nanotubes de carbone

Agathe Figarol

► **To cite this version:**

Agathe Figarol. Toxicité in vitro et propriétés physico-chimiques de nanotubes de carbone. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2014. Français. NNT : 2014EMSE0764 . tel-01127343

HAL Id: tel-01127343

<https://theses.hal.science/tel-01127343>

Submitted on 7 Mar 2015

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.



NNT : 2014 EMSE 0764

THÈSE

présentée par

Agathe FIGAROL

pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des Procédés

TOXICITE *IN VITRO* ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE NANOTUBES DE CARBONE

soutenue à Saint-Etienne, le 13 novembre 2014

Membres du jury

Président :

Rapporteurs : Emmanuel FLAHAUT Directeur de recherche CNRS, Université Paul Sabatier,
Toulouse

Bice FUBINI Professeur, Faculté de pharmacie, Turin

Examineurs : Jean-Marc TULLIANI Professeur, Politecnico, Turin

Marie CARRIERE Chercheur, CEA Grenoble

Jérémie POURCHEZ Maître de recherche, Ecole des Mines de Saint-Etienne

Delphine BOUDARD Maître de conférences des universités, CHU de Saint-Etienne

Directeurs de thèse : Philippe GROSSEAU Directeur de recherche, Ecole des Mines de Saint-Etienne

Didier BERNACHE Professeur émérite, Ecole des Mines de Saint-Etienne

Invités: Valérie FOREST Maître assistant, Ecole des Mines de Saint-Etienne

Jean-Pierre LECOMPTE Maître de conférences, Université de Limoges

Spécialités doctorales	Responsables :	Spécialités doctorales	Responsables
SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX	K. Wolski Directeur de recherche	MATHEMATIQUES APPLIQUEES	O. Roustant, Maître-assistant
MECANIQUE ET INGENIERIE	S. Drapier, professeur	INFORMATIQUE	O. Boissier, Professeur
GENIE DES PROCEDES	F. Gruy, Maître de recherche	IMAGE, VISION, SIGNAL	JC. Pinoli, Professeur
SCIENCES DE LA TERRE	B. Guy, Directeur de recherche	GENIE INDUSTRIEL	A. Dolgui, Professeur
SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT	D. Graillot, Directeur de recherche	MICROELECTRONIQUE	S. Dauzere Peres, Professeur

EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

ABSI	Nabil	CR		CMP
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2		FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR		SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BERGER DOUCE	Sandrine	PR2		FAYOL
BERNACHE-ASSOLLANT	Didier	PR0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean Pierre	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaid	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
BURLAT	Patrick	PR2	Génie Industriel	FAYOL
COURNIL	Michel	PR0	Génie des Procédés	DIR
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	CR	Image Vision Signal	CIS
DELAFOSSÉ	David	PR1	Sciences et génie des matériaux	SMS
DESRAYAUD	Christophe	PR2	Mécanique et ingénierie	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR0	Génie Industriel	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FEILLET	Dominique	PR2	Génie Industriel	CMP
FEVOTTE	Gilles	PR1	Génie des Procédés	SPIN
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
HAN	Woo-Suck	CR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
LI	Jean-Michel		Microélectronique	CMP
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MONTHEILLET	Frank	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NEUBERT	Gilles			FAYOL
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre			CMP
NORTIER	Patrice	PR1		SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Image Vision Signal	CIS
POURCHEZ	Jérémy	CR	Génie des Procédés	CIS
ROBISSON	Bruno			CMP
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)		CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)		FAYOL
ROUX	Christian	PR		CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzystof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR1	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

ENISE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

BERGHEAU	Jean-Michel	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
BERTRAND	Philippe	MCF	Génie des procédés	ENISE
DUBUJET	Philippe	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
FEULVARCH	Erie	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
FORTUNIER	Roland	PR	Sciences et Génie des matériaux	ENISE
GUSSAROV	Andrey	Enseignant contractuel	Génie des procédés	ENISE
HAMDI	Hédi	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
LYONNET	Patrick	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
RECH	Joël	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
SMUROV	Igor	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
TOSCANO	Rosario	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
ZAHOUANI	Hassan	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE

“How strange and how lovely it is to be anything at all.”

John Green, *The Fault in Our Stars*

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est l'aboutissement de trois années de thèse extrêmement enrichissantes tant d'un point de vue professionnel que personnel. A travers ces quelques lignes je tiens à remercier toutes les personnes ont participé à ces travaux en m'apportant leur expertise, leurs conseils et leur soutien.

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de mon jury. Merci au Professeur Jean-Marc Tulliani d'avoir accepté de présider ce jury et d'avoir suivi cette thèse depuis son commencement. Merci à Emmanuel Flahaut et Bice Fubini d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci à eux trois ainsi qu'à Marie Carrière pour avoir bien voulu juger ces travaux.

Je suis également très reconnaissante à tous mes encadrants qui ont su chacun m'apporter leur aide et leurs conseils dans leur domaine de prédilection, tout en gardant une ouverture sur les domaines adjacents. Je tiens ainsi à remercier Philippe Grosseau et Didier Bernache, mes deux directeurs de thèse pour m'avoir donné la possibilité de réaliser cette thèse au sein de l'Ecole des Mines de St-Etienne dans un contexte pluridisciplinaire qui vous tient à cœur. Un grand merci à Jérémie Pourchez, qui a su insuffler son énergie et ses idées fourmillantes dans ces travaux et sans qui cette thèse n'aurait pas été aussi aboutie. Merci aussi à Delphine Boudard et à Valérie Forest, mes supports du côté biologie, tout particulièrement à Delphine pour avoir voulu aller plus loin en développant des nouveaux outils qui sont une valeur ajoutée à ma thèse ; et à Valérie pour le développement de notre laboratoire biologie côté Mines.

Au cours de cette thèse, de nombreuses personnes m'ont aidée à découvrir de nouveaux outils, m'ont guidée dans leur apprentissage. Ainsi, je souhaite exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont participé directement à mes travaux. Côté SPIN merci à Guy Tournier, Yamina Ouabbas, Frédéric Gallice, Marc Rouvière, Marie-Claude Bartholin, et à ma stagiaire Céline Akono. Côté CIS merci à Lara Leclerc et Gwendoline Sarry. Côté SMS merci à Maryline Mondon, Sergio Sao-Joao, Yann Garnier, Vincent Barnier, Christophe Meunier et Dominique Goeuriot. Et enfin, côté LINA, merci à Valérie Bin, Odile Sabido et Pierre Chapuis. Merci également à Sara Berhanu et Alain Thorel de l'Ecole des Mines de Paris pour leur travail sur la HR-MET.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel qui a gravité autour de ma thèse et qui ont pu m'apporter une aide précieuse : Carole Bigouraux, Françoise Bresson, Jérôme Mancuso, et Jean-Pierre Poyet. J'en profite pour remercier les autres membres « permanents » du C3 et de sa légendaire pause-café : Henri Besset, Nathalie Douard, Coralie Laurent, David Marchat, et Laëtitia Vielle.

Merci également à l'équipe de la Rotonde et particulièrement à Emmanuel Barroux pour nos expéditions dans les collèges et les lycées des environs, où l'on essayait de faire naître curiosité et envie d'explorer la science de manière ludique.

Enfin, ces trois ans n'auraient pas été les mêmes sans la super équipe de doctorants avec lesquels j'ai passé des moments inoubliables ! Tout d'abord, les trois autres fantastiques : Andréa, Jules et Estelle. Je ne saurais vous dire combien vous comptez pour moi. Andréa merci pour les sorties, les voyages, les discussions à n'en plus finir sur la thèse et bien plus ! Jules, merci d'avoir été le premier à m'avoir accueillie chez toi, et je suis ravie qu'on ait autant profité de cette dernière année. Merci à vous d'avoir été là. Un grand merci à Olivier, notamment pour les découvertes musicales et viticoles, et à Maxym pour ta gentillesse et ta papa mobile qui nous a bien aidé ! Merci aussi aux anciens : Thomas (Cobureau !) et Antoine, et aux moins anciens : Franck, Dimitri, et Baptiste pour les délires et les débats sur des sujets cruciaux en salle de pause et au Soggy. Vous avez (mal)heureusement fini par influencer ma façon de penser ! Et bienvenue aux petits nouveaux : Jie, Jessie et Xavier. Et bien sûr, merci à ceux de l'équipe de choc de l'ASEC que je n'ai pas encore nommé : Clotilde, Fiona et Laura (mes chéries !), Aurélien, Giacomo, Guillaume, Aly, et Amélie ! Ainsi qu'à tous ceux qui donnent un coup de main : Gaëlle, Pierre et Damien ; et à ceux qui se sont rattachés à ce petit groupe : Binh Minh, Marine, Zhiguo, Jean-Philippe, Aurélien, Alexia, Aurélie... Et n'oublions pas les doctorants exilés du J et du K : Fanette, Klervi, David, Omar, Boris, Pierre, Rebecca, et anciennement Aaron et Pierre-Yves. Ce qui me donne l'occasion de remercier les autres motivés du comité de la recherche : Raquel, Lucile, et Andréa (mais je pourrai te citer partout !).

Et puis merci aux amis de plus loin notamment aux Compiègnais : Manue, Mathieu, Aurore, Stef, Anne-Claire, Marie-Aude, Sophie et Rémi ; et à Rilou.

Et bien sûr, bien évidemment, merci à ma famille.

Sommaire

Sommaire	i
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
Introduction	1
Chapitre 1. Etat de l'art	5
I. Les nanotubes de carbone	7
I.1. Nanomatériaux	7
I.2. Les nanotubes de carbone.....	10
I.2.1. Sources et structure	10
I.2.2. Production	13
I.2.3. Propriétés et applications	14
I.3. Risques liés aux nanotubes de carbone	16
I.3.1. La question du risque	16
I.3.2. Exposition.....	16
I.3.3. Réglementation et démarches de prévention du risque lié aux nanotubes de carbone	24
II. Toxicité pulmonaire <i>in vivo</i> chez l'animal.....	29
II.1. Toxicité systémique et cytotoxicité	29
II.2. Inflammation.....	30
II.3. Granulomes inflammatoires.....	31
II.4. Structures fibreuses et fibrose.....	32
II.5. Biodistribution et biopersistance	32
II.6. Stress oxydant et génotoxicité.....	35
BILAN ETAT DE L'ART : Toxicité pulmonaire <i>in vivo</i> chez l'animal	38
III. Toxicité pulmonaire <i>in vitro</i>	39
III.1. Modèles et réponses cellulaire	39
III.1.2. Macrophages alvéolaires	39
III.1.2. Principales réponses cellulaires.....	43

III .2. Limitations des études	47
III.2.1. Dose.....	47
III.2.2. Interférences avec les tests biologiques.....	48
III.2.3. Dispersion.....	48
III.2.4. Nécessité d'une caractérisation physico-chimique rigoureuse des nanotubes de carbone	50
III.3. Caractéristiques physico-chimiques des nanotubes de carbone et réponse biologique.....	52
III.3.1. Taille	52
III.3.2. Impuretés catalytiques.....	54
III.3.3. Défauts et désordre structurel	56
III.3.4. Fonctionnalisation de surface	60
III.3.5. Morphologie : comparaison avec le nano-graphite et le noir de carbone	66
BILAN ETAT DE L'ART : Toxicité pulmonaire <i>in vitro</i>	73
IV. Synthèse et objectifs	74
Chapitre 2. Impacts biologiques d'une fonctionnalisation acide.....	75
I. Introduction et méthodologie	76
II. Publication 1	78
II.1. Article paru dans Journal of Nanoparticle Research	78
II.2. Supporting information	79
III. Données complémentaires	85
III.1. Interférences dans la mesure du stress oxydant.....	85
III.2. Fonctionnalisation industrielle	86
BILAN CHAPITRE 2 : Impacts biologiques d'une fonctionnalisation acide	95
Chapitre 3. Impacts biologiques d'un recuit haute température	97
I. Introduction et méthodologie	99
II. Publication 2.....	100
II.1. Article soumis à Journal of Nanoparticle Research	100
II.2. Supplementary data.....	122
III. Données complémentaires	128
BILAN CHAPITRE 3 : Impacts biologiques d'un recuit haute température	134

Chapitre 4. Comparaison des impacts biologiques de nanomatériaux à base de carbone	135
I. Introduction et méthodologie.....	137
II. Publication 3.....	138
II.1. Article soumis à Journal of Nanoparticle Research.....	138
II.2. Supplementary data	163
BILAN CHAPITRE 4 : Comparaison des impacts biologiques de nanomatériaux à base de carbone	168
Chapitre 5. Etudes exploratoires	169
I. Interférences possibles avec les autres tests de toxicité	171
I.1. Interférences possibles dans la mesure du TNF- α	171
I.2. Interférences possibles dans la mesure de la lactate déshydrogénase.....	172
I.2.1. Bilan bibliographique sur les biais du test LDH	172
I.2.2. Méthodologie pour la détection des biais du test LDH.....	174
I.2.3. Mise en évidence de biais pour le test LDH.....	176
I.2.4. Conclusion sur les biais du test LDH	185
II. Etude approfondie sur les espèces oxydantes par cytométrie en flux	186
II.1. Objectifs et méthodologie	186
II.2. Production de radicaux libres	187
II.2.1. ROS large spectre.....	187
II.2.2. Radicaux hydroxyles	187
II.2.3. Anions superoxydes.....	188
II.2.4. Peroxynitrites	189
II.3. Discussion autour de l'étude des radicaux libres.....	189
BILAN CHAPITRE 5 : Etudes exploratoires	194
Conclusion	195
Références	201
Annexes	225

Liste des figures

Figure 1 : Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (CEA 2005)	9
Figure 2 : Schéma de nanotube de carbone simple-feuillet (A) et double-feuillet (B) avec des dimensions spécifiques (Reilly 2007)	11
Figure 3 : Schéma des différentes chiralités possible d'un nanotube (Grady 2002).....	12
Figure 4 : Schéma de l'enroulement du feuillet de graphène en fonction de la chiralité des nanotubes de carbone. T : axe du tube, a1, a2 : vecteurs unitaires.....	12
Figure 5 : Situations d'expositions au regard du cycle de vie de nanoparticules (source www.nanosmile.org).....	17
Figure 6 : Pourcentage des particules déposées dans les différentes régions de l'appareil respiratoire en fonction de la taille des particules sphériques et non-agglomérées considérées (d'après Witschberg & Fabriès 2005).....	18
Figure 7 : Différents mécanismes de dépôts des particules inhalées dans les voies respiratoires (Hervé-Bazin 2006).....	19
Figure 8 : Pictogramme « Risque d'exposition aux nanomatériaux » proposé par l'INRS (Ricaud 2012).....	28
Figure 9 : Coupe pulmonaire colorée au rouge Sirius (C) d'une souris témoin non exposée, et (D) d'une souris exposée par aspiration pharyngale à 40 µg de SWCNT : présence de granulomes multifocaux et d'amas de SWCNT (Shvedova 2005).....	31
Figure 10 : Représentation schématique des poumons, avec un zoom sur la structure de la plèvre (OpenStax College 2013)	33
Figure 11 : Schéma représentant le passage des nanotubes de carbone dans l'espace pleural, ainsi que les mécanismes de défense mis en jeu (d'après Donaldson et al. 2010).....	33
Figure 12 : Biodistribution et biopersistance de MWCNT marqués radioactivement (10-20 nm de diamètre, 10-600 nm de long) après exposition par voie intraveineuse (A), ou intratrachéale chez des souris(B) (Deng et al. 2007).....	34
Figure 13 : Pourcentage de la dose administrée (%ID) de MWCNT marqués par du ¹⁴ C après exposition à 20 µg par souris par aspiration pharyngale présente dans a) les poumons, b) la rate et c) le foie. Les MWCNT ont un diamètre moyen de 40 nm, et une longueur moyenne de 3,9 µm (Czarny et al. 2014).	35
Figure 14 : Mortalité induite par mésothéliome après exposition intrapéritonéale à des MWCNT (70-100 nm, 1-20 µm, Fe 0,35%, S 0,05%) (Takagi et al. 2012).....	37
Figure 15 : Schéma de l'appareil respiratoire humain (adapté de Mariana Ruiz Villarreal) ...	40

Figure 16 : Schéma structurel d'une alvéole pulmonaire (adapté de Hawgood & Clements 1990)	40
Figure 17 : Schéma des différentes étapes de la phagocytose (adapté de Boumahdi 2009)..	42
Figure 18 : Représentation schématique de l'apoptose : mort cellulaire physiologique, qui peut toutefois avoir lieu dans un contexte pathologique, et de la nécrose : mort cellulaire pathologique (adapté de Roche Diagnostics 2008).....	43
Figure 19 : Schéma de la balance du stress oxydant entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les systèmes antioxydants (d'après Delattre et al. 2005).....	45
Figure 20 : Représentation schématique de la formation de faisceaux par addition successive de nanotubes de carbone (Peigney et al. 2001).	49
Figure 21 : Modèle de phagocytose frustrée vis-à-vis de fibres d'amiante courtes et longues (à gauche) et de nanotubes de carbone de différentes morphologies (à droite) (Donaldson et al. 2010).....	54
Figure 22 : Spectre RPE présentant la formation de radicaux OH• en milieu acellulaire de chrysolite a) brute, b) enrichie en Fe 0,67 %m., e) enrichie en Fe 1,78 %m. (Turci et al. 2011)	55
Figure 23 : Géométrie d'un carbone sp ² dans un système plan (feuille de graphène) et courbé (nanotubes de carbone) (Cabana 2010).....	57
Figure 24 : Défauts de structure des CNT les plus communs. A gauche, « vacancies » : lacunes, « edges » : arêtes, « adatoms » : adatoms, « interstitials » : carbone interstitiels (Lehman et al. 2011). A droite, défaut de Thriwer-Stone-Wale (Galano et al. 2010).....	57
Figure 25 : Images de microscopie électronique à transmission de haute résolution (HR-TEM), A) et B) nanotubes de carbone avec une structure en « bambou » (Lee et al. 2000), C) et D) nanotubes de carbone avec une structure en « chevron » (Cheng et al. 2013)	59
Figure 26 : Représentation schématique des classes possibles de SWCNT fonctionnalisés : A) fonctionnalisation covalente sur défauts de structure, B) fonctionnalisation covalente sur parois, C) fonctionnalisation non-covalente avec un tensio-actif, D) fonctionnalisation non-covalente avec un polymère, E) fonctionnalisation endoédrique (Jeon et al. 2011)	61
Figure 27 : Nombre d'articles recensés sur les principaux types de CNT fonctionnalisés. Recherche dans Word of Knowledge pour "carbon nanotubes functionalization" + le type de fonctionnalisation (le 24/01/2014).....	62
Figure 28 : Groupements acides greffés en surface d'un feuillet de graphène après fonctionnalisation acide (Jastrzębska et al. 2012).....	62
Figure 29 : Comparaison de la cytotoxicité (test MTS) sur différentes lignées cellulaires exposées durant 24h à 100 µg.mL ⁻¹ de CNT petits : SCNT, SCNTc (fonctionnalisés à l'acide), CNT8 (diamètre < 8 nm), CNT8c ; de taille moyenne : CNT20 (diamètre de 20 à 30 nm), CNT20c ; et épais : CNT50 (diamètre > 50 nm), CNT50c (Fröhlich et al. 2012).....	64

Figure 30 : Schéma de la structure de nanotubes de carbone et de nano-graphite.....	67
Figure 31 : Protocole de fonctionnalisation acide de nanotubes de carbone (CNT).....	76
Figure 32 : Plaque 6 puits remplie avec différentes dilutions de CNT	85
Figure 33 : Image de microscopie à balayage (FEG-SEM), A) nanotubes de carbone bruts (sCNT), B) fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf), et C) fonctionnalisés à l'acide au laboratoire (sCNTf).....	88
Figure 34 : Comparaison des spectres Raman de nanotubes de carbone bruts (sCNT), fonctionnalisés à l'acide par un industriel (ind. sCNT) et au sein du laboratoire (sCNT).	89
Figure 35 : Suivi par thermodésorption de la composition chimique des espèces adsorbées en surface de nanotubes bruts (sCNT) et fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf).....	90
Figure 36 : Macrophages murins RAW 264.7 après coloration MGG, après étalement sur une lame par cytopspin. A) cellules témoins, B) cellules exposées 24 h à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone bruts, C) cellules exposées 24 h à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone fonctionnalisés à l'acide industriellement.	91
Figure 37 : Etude de la cytotoxicité par mesure de la LDH relarguée après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (sCNT) ou fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf).	92
Figure 38 : Etude de la réponse pro-inflammatoire par dosage du TNF- α après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (sCNT) ou fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), # : résultats significativement différent entre les types de CNT.	93
Figure 39 : Etude du stress oxydant par dosage des ROS après 90 min de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (sCNT) ou fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$).....	94
Figure 40 : Images de microscopie électronique à balayage (FEG-SEM) de nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3).....	128
Figure 41 : Comparaison des spectres Raman de nanotubes de carbone bruts (CNT, en noir), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa, en rouge), 2 h à 2000°C (CNT2, en bleu), et 3 h à 2000°C (CNT3, en vert).....	129
Figure 42 : Macrophages murins RAW 264.7 après coloration MGG. Cellules témoins, CNT : cellules exposées 24 h à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone bruts, CNTa cellules exposées 24 h à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone recuits à 2125°C 1h, CNT2 cellules exposées 24 h à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone recuits à 2125°C 1h.....	130

Figure 43 : Etude de la cytotoxicité par mesure de la LDH relarguée après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), NS : résultats non significativement différents entre les types de CNT.	131
Figure 44 : Etude de la réponse pro-inflammatoire par dosage du TNF- α après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), # : résultats significativement différents entre les types de CNT.....	132
Figure 45 : Etude du stress oxydant par dosage des ROS après 90 min de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT) recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), NS : résultats non significativement différents entre les types de CNT.	132
Figure 46 : Mise en évidence de l'adsorption de la LDH sur des nanoparticules à base de carbone : pourcentage de LDH (de concentration initiale 0,15 U/mL) dans le surnageant (centrifugation 10 min à 115 g) a) après 15 min d'incubation avec différentes doses de nanoparticules, b) après 5 à 60 min d'incubation avec 46 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanoparticules (Holder et al. 2012, p.2).....	173
Figure 47 : Principe du test colorimétrique de dosage de la LDH.....	175
Figure 48 : Schéma de la mesure de l'absorbance. I_0 : intensité lumineuse émise par le spectroscope (à une longueur d'onde fixée), I : intensité transmise.....	175
Figure 49 : Résultats classiques en absorbance obtenus avec le test de quantification de la LDH. Production de LDH après 24 h d'exposition à des CNT (article n°1).....	176
Figure 50 : Absorbance à 450 nm avec CNT bruts pour différentes dilutions de solution commerciale de LDH dans du milieu de culture. (* $p < 0,05$ test de Student. A la dilution 1/1620 $n=1$ et à la dilution 1/540 $n=2$ uniquement)	177
Figure 51 : Absorbance des CNT à 450 nm avec les réactifs du test LDH ou avec un équivalent en volume de tampon phosphate salin (PBS pour « phosphate buffered saline »)..	178
Figure 52 : Courbe étalon de l'absorbance à 450 nm en fonction de la concentration en LDH sans CNT.	178
Figure 53 : Mise en évidence de la différence d'absorbances théoriques et expérimentales du mélange d'une dilution de LDH avec les suspensions de CNT. Dilution à 1/540 de la solution commerciale, soit $1,48 \cdot 10^{-3} \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	179

Figure 54: Evolution de l'absorbance du mélange CNT + LDH en fonction de la concentration en CNT.....	179
Figure 55 : LDH libre dans le milieu en fonction de la concentration en CNT, pour différentes concentrations initiales de LDH (dilutions de 1/180 à 1/14580 d'une solution commerciale à 0,8 U. μ L ⁻¹).....	180
Figure 56 : LDH adsorbée sur les CNT, pour différentes concentrations initiales de LDH (dilutions de 1/180 à 1/14580 d'une solution commerciale à 0,8 U. μ L ⁻¹).	180
Figure 57 : Isotherme d'adsorption de la LDH sur les CNT pour différentes dilutions de la concentration commerciale en LDH (dilutions de 1/180 à 1/14580 d'une solution commerciale à 0,8 U. μ L ⁻¹) : A) présenté par quantité en masse en μ g de CNT, B) présenté par surface en m ² de CNT.....	181
Figure 58 : Régression linéaire pour la détermination des paramètres du modèle de Langmuir.....	183
Figure 59 : Isotherme d'adsorption de la LDH sur les CNT avec la courbe du modèle de Langmuir après calcul des paramètres ($neqmCNT=0,7$ et $\alpha=30,14$).....	183
Figure 60 : Isotherme d'adsorption de la LDH sur les CNT avec les courbes des modèles Hasley, Temkin-Pyzhev et Freundlich.....	184
Figure 61 : LDH corrigée et non corrigée pour les macrophages exposés 24 h aux sCNT. * $p<0,05$ significativement différent du témoin négatif (test de Student).....	185
Figure 62 : Production de ROS analysée en cytométrie en flux (sonde DCFH-DA), après exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf). ** : significativement différent du témoin $p<0,01$ test ANOVA et test de Bonferroni.	187
Figure 63 : Production de radicaux hydroxyles analysée en cytométrie en flux (sonde CellROX green), induite par une exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement différent $p<0,05$, *** : $p<0.001$, test ANOVA et test de Bonferroni.....	188
Figure 64: Production d'anions superoxydes analysée en cytométrie en flux (sonde HE), induite par une exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement différent $p<0,05$, ** : $p<0,01$, *** : $p<0.001$, test ANOVA et test de Bonferroni.....	188
Figure 65 : Production de peroxydinitrites analysée en cytométrie en flux (sonde HPF), induite par une exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf).	189

Figure 66 : Activité de la catalase induite par une exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf). Dosage par le kit Amplex Red Catalase (Molecular Probes). 190

Figure 67 : Profil des pics d'iodure de propidium en fonction du nombre d'événements (nombre de cellules) pour A) les cellules seules, B) les cellules traitées 90 min avec 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CNT bruts et C) les cellules traitées 90 min avec 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CNT bruts. 192

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques et propriétés des nanotubes de carbone (d'après Baughman et al. 2002; Ricaud et al. 2008; Laurent et al. 2010).....	14
Tableau 2 : Synthèse des études sur l'exposition aux nanotubes de carbone.	22
Tableau 3 : Valeurs d'exposition limites recommandées pour les CNT.....	27
Tableau 4 : Classement des principaux défauts et désordres structuraux des nanotubes de carbone (d'après Collins 2010).....	58
Tableau 5 : Synthèse des études comparatives des nanotubes de carbone (CNT, CNTf si fonctionnalisés à l'acide), du graphène ou nano-graphite (G et NG respectivement, éventuellement oxydés : GO et NGO respectivement).....	69
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques de nanotubes de carbone bruts (sCNT), fonctionnalisés à l'acide par un industriel (ind. sCNT) et au sein du laboratoire (sCNTf).	88
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques de nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3).....	129
Tableau 8 : Paramètres du pic G0/G1, indicateurs de la décompaction de l'ADN.....	193
Tableau 9 : Résumé de la réponse cellulaire des CNT en fonction de leurs principales caractéristiques physicochimiques : - : nulle, + : modérée, ++ : importante, +++ très importante, / : non mesurée, * : non cristallisés donc Id/Ig peu fiables. CNT : nanotubes de carbone, CB : noir de carbone, NG : nano-graphite, s : small, b : grand, f : fonctionnalisés à l'acide, d : désorbés après fonctionnalisation.....	199

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AFM : Microscopie à force atomique
- Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
- ALARA : « as low as reasonably achievable » aussi faible que possible
- AMLV : « Albeson murine leukemia virus » virus leucémique murin d'Albeson
- Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail
- ARNm : Acide Ribonucléique messagers
- B.E.T. : Brunauer Emmett Teller
- BSI : British Standard Institution
- CB : Carbon black, noir de carbone
- CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
- CNT : « Carbon nanotubes » nanotubes de carbone
- CVD : Carbon vapour deposition
- DCF : 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine
- DCFH-DA : 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate
- DLS : Diffusion dynamique de la lumière
- DWCNT : « Doubled-walled Carbon Nanotubes » nanotubes de carbone double-feuillets
- ELISA : « Enzyme-linked immunosorbent assay », test immuno-enzymatique
- FBS : « Fœtal bovine serum » ou sérum de veau fœtal en français
- FEG : « Field emission gun » canon à émission de champ
- FSC : « Forward scatter channel » canal de diffusion avant
- GHS : « Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals » système général harmonisé de classification chimique
- GSH : Glutathion réduit
- HCSP : Haut conseil de la santé publique
- HE : Hydroéthidine
- HPF : Hydroxyphényl fluorescéine
- HRP : « HorseRadish Peroxydase » peroxydase de raifort, : Horseradish peroxidase
- ICP-AES : Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif
- IFA : « Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung » Institut pour la santé et la sécurité au travail de l'assurance sociale allemande.
- IL-1 β : Interleukine 1 β

IL-6 : Interleukine 6

INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques

INRS : Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

InVS : Institut de veille sanitaire

IP : Iodure de propidium

ISO : « International Organization for Standardization » organisation internationale de normalisation

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LDH : Lactate déshydrogénase

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscope Electronique à Transmission

MGG : Coloration de May-Grünwald Giemsa

MPO : Myéloperoxydase humaine

MWCNT : « Multi-Walled Carbon Nanotubes » nanotubes de carbone multi-feuillets

NG : Nano-graphite

NICNAS : « National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme » institution gouvernementale australienne d'évaluation et de notification des produits chimiques industriels

NM : Nanométariaux

NOAA : Nano-objets, leurs agrégats et agglomérats

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

PBS : « Phosphate buffered saline » tampon phosphate salin

pI : Point isoélectrique

QSAR : « Quantitative structure-activity relationship » pour relation quantitative structure à activité

REACH : « Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances » cadre réglementaire de gestion des substances chimiques

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SOD : Superoxyde dismutase

SSC : « Side scatter channel » canal de diffusion de côté

SWCNT : « Single-Walled Carbon Nanotubes » nanotubes de carbone simple feuillet

TDS : Spectrométrie de masse de thermodésorption

TNF- α : « Tumor Necrosis Factor α », facteur α de nécrose tumorale

XPS : Spectrométrie de photoélectrons induits par les rayons X

Introduction

Les nanotechnologies ont pris un essor considérable depuis quelques années. Elles se développent dans un contexte multidisciplinaire liant notamment chimie, physique, et biologie. L'engouement suscité par les applications révolutionnaires promises par les nanomatériaux fait toutefois face à une certaine inquiétude et des interrogations du grand public. Celles-ci sont provoquées par la présence de risques mal identifiés et mal maîtrisés pour la santé et l'environnement. La crainte d'une possible toxicité des nanomatériaux est renforcée par les premières études exposant des résultats souvent peu comparables et contradictoires.

Les nanotubes de carbone (CNT) sont un très bon exemple de ce partage d'opinion. Leurs propriétés mécaniques, électriques, et thermiques hors normes éveillent un intérêt certain des industriels y voyant l'opportunité de développer des applications de pointe. Néanmoins, la similarité de forme de certains types de CNT avec l'amiante fait craindre une pathogénicité comparable. L'inhalation est en effet la voie d'exposition la plus importante en terme de probabilité et de risque. Le diamètre nanométrique de ces fibres, permet aux CNT d'accéder aux alvéoles pulmonaires. Il leur est alors possible d'entraîner une réponse inflammatoire et un stress oxydant qui pourraient mener à une pathogénicité dans le cadre d'une exposition chronique. Cependant, il n'existe pas une toxicité unique des CNT. Leur potentiel toxique dépend notamment de leurs caractéristiques physico-chimiques. L'analyse systématique de la toxicité de chaque type de CNT est irréalisable, car trop coûteuse en terme de temps et de moyens financiers. Comprendre l'impact des caractéristiques physico-chimiques sur la réponse cellulaire permet de fournir des pistes pour concevoir des CNT à l'impact biologique minimisé. C'est ce que l'on appelle l'approche « safer by design ».

Dans cette thèse, nous allons analyser les effets sur la toxicité *in vitro* de CNT de deux traitements réalisés en post-production industrielle. Leur étude permettra de mieux appréhender l'impact de la chimie de surface des CNT sur les réponses cellulaires d'une lignée de macrophages, particulièrement la présence de groupements oxygénés, d'impuretés métalliques, ainsi que le taux de défauts de structure. Dans un premier chapitre, nous présenterons les principales caractéristiques des CNT et un état de l'art résumera les principales observations quant à leur toxicité pulmonaire. Chacun des trois chapitres suivants sera constitué d'une introduction spécifique au thème abordé, d'un article scientifique, et d'éventuelles données complémentaires. Le second chapitre sera ainsi consacré à l'étude des impacts biologiques d'une fonctionnalisation acide de CNT. Le troisième chapitre décrira les effets sur la réponse cellulaire d'un recuit haute température. Le quatrième chapitre comparera la toxicité *in vitro* de trois nanomatériaux à base de carbone (CNT, nano-graphite et noir de carbone) après leur fonctionnalisation acide. Enfin, un cinquième chapitre introduira des études exploratoires sur les interférences possibles des CNT avec les tests classiques de toxicité, ainsi que la mise en place au sein du laboratoire d'une étude plus poussée sur le stress oxydant. Une conclusion générale clôturera ce manuscrit.

Chapitre 1. Etat de l'art

I. Les nanotubes de carbone

I.1. Nanomatériaux

Dans son discours pour la réunion annuelle de l'« American Physical Society », Feynman (1959) fut le premier à introduire la notion de nanotechnologies, mais ne formalisera pas une définition de ce nouveau champ de recherche. Dû à la pluridisciplinarité et la complexité de ce domaine, différentes définitions ont été proposées au sein des organismes de recherche et de réglementation. La diversité de taille, de forme, de source et de nature chimique des nanomatériaux (NM) rend la tâche ardue. Les NM peuvent ainsi être de source naturelles ou anthropogéniques (accidentelles ou intentionnelles). Selon les documents techniques ISO/TS27687 (2008) et ISO/TS80004-4 (2011) le domaine de dimension nanométrique est compris entre 1 et 100 nm approximativement. Les matériaux ayant une dimension externe à l'échelle nanométrique ou étant structurés intentionnellement afin de présenter des structures internes ou de surface à l'échelle nanométrique sont définis comme étant des nanomatériaux. Dans ce groupe, sont compris les nano-objets, matériaux présentant une à trois dimensions externes dans le domaine nanométrique. Les nano-objets se subdivisent selon la répartition suivante en trois catégories :

- 3 dimensions nanométriques : nanoparticules (ex : noir de carbone)
- 2 dimensions nanométriques : nanoplaques (ex : graphène)
- 1 dimension nanométrique : nanofibres (ex : nanotubes de carbone).

La Commission Européenne, dans sa recommandation d'Octobre 2011 (2011/696/UE), s'appuie sur une même base, mais élargit l'appartenance aux nanomatériaux à tous les matériaux nanostructurés. Sont ainsi pris en compte les agglomérats ou agrégats, et les matériaux constitués d'un minimum de 50% en nombre de particules dont les dimensions initiales sont comprises entre 1 nm et 100 nm. Ces spécifications s'accompagnent toutefois avec prudence de dérogations possibles sur la proportion et la taille pour de futures réglementations. Les fullerènes, le graphène et les nanotubes de carbone simple feuillet de diamètre inférieur à 1 nm font d'ailleurs le cas d'une dérogation afin de les considérer comme nanomatériaux. Le document technique ISO/TS12901 (2012b) reprend cette notion en discutant des risques liés aux NOAA : nano-objets, leurs agrégats et agglomérats.

Le texte de la Commission Européenne fait aussi mention de la surface spécifique, notion essentielle de caractérisation d'un objet nano-dimensionné dont les propriétés de surface prévalent sur la masse et le volume. En effet, les rapports surface/masse, ou surface/volume sont beaucoup plus importants pour des nanoparticules que pour des particules micrométriques.

Ceci souligne l'importance toute particulière des caractéristiques de surface dans les interactions des nanomatériaux avec leur environnement, et notamment avec le vivant. Les objets à l'échelle nanométrique sont de taille comparable à de nombreuses entités biologiques : ADN (Acide désoxyribonucléique 3,4 nm), membrane cellulaire (8 nm) et virus (100 nm) par exemple (**Figure 1**, CEA 2005). Ils sont de ce fait très susceptibles d'interagir avec eux suivant des mécanismes encore assez mal définis.

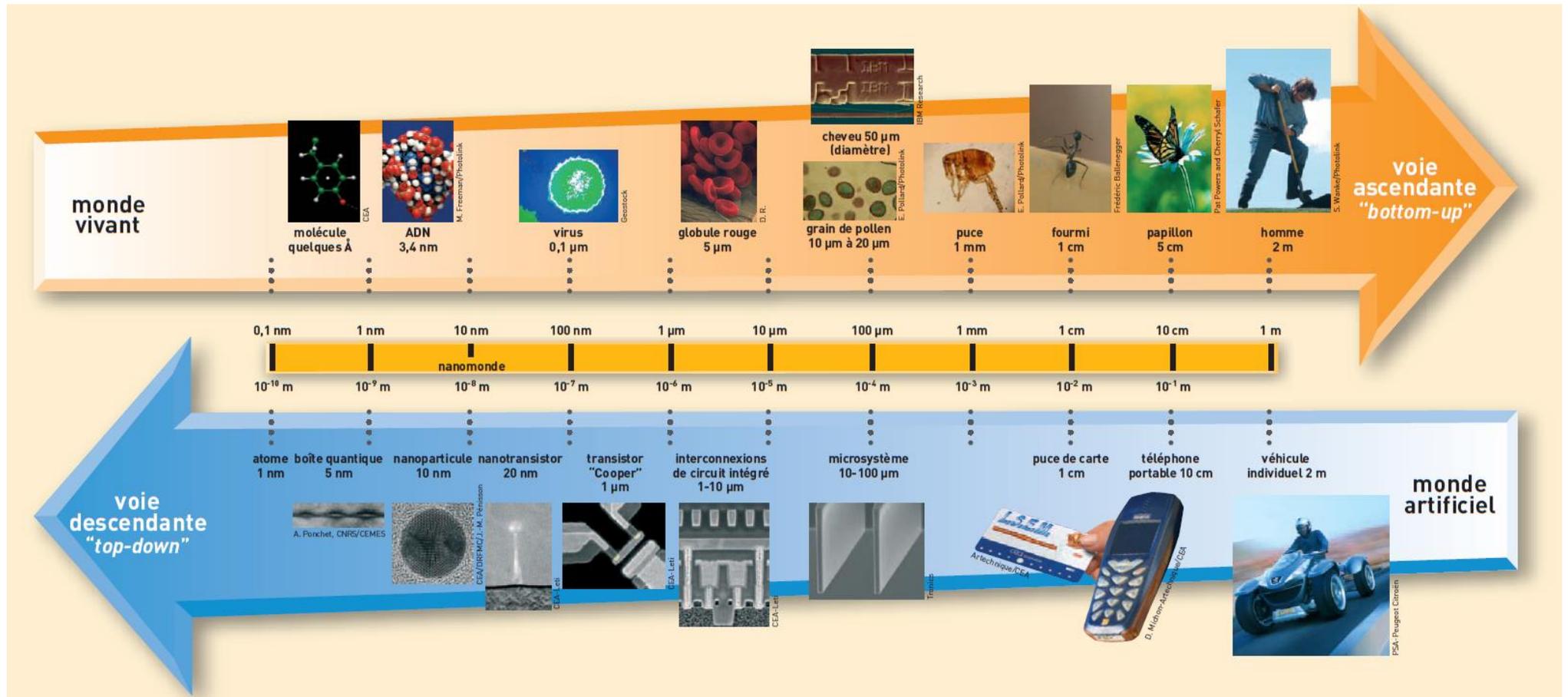


Figure 1 : Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (CEA 2005)

I.2. Les nanotubes de carbone

I.2.1. Sources et structure

Les nanotubes de carbone (CNT pour « carbon nanotubes ») sont une nouvelle forme allotropique du carbone. Ils ont été observés dès les années 1950 avec le développement de microscopes électroniques de plus en plus puissants (Radushkevich & Lukyanovich 1952), mais c'est seulement en 1991 qu'ils seront caractérisés pleinement par le physicien japonais Sumio Iijima (Iijima 1991). Cependant, les CNT ont été utilisés bien avant le développement des techniques modernes permettant leur détection. Ainsi, un sabre d'acier fabriqué au XVIème siècle, appelé sabre de Damas, connu pour le tranchant de sa lame devrait ses propriétés uniques à l'utilisation de nanotubes de carbone (Reibold et al. 2006).

Il existe une faible quantité de CNT de source naturelle dans l'air, provenant de combustions ; cependant dû aux conditions très particulières de formation de ces CNT, il ne s'agit là que d'une quantité négligeable au regard des CNT produits par l'homme. Une partie de ces CNT anthropogéniques sont produits involontairement, en industrie lors d'utilisation d'arc électrique avec des cibles de carbone par exemple, mais aussi lors de combustions de gaz naturel couramment utilisé de manière domestique (Murr & Soto 2004). Toutefois une grande majorité des CNT est produite par des industriels soucieux d'exploiter ou de permettre l'exploitation de leurs nombreuses propriétés exceptionnelles (qui seront développées dans le paragraphe I.2.3. Propriétés et applications), et contrôlant du mieux que possible leurs caractéristiques physico-chimiques.

Le graphène constitue l'élément structurel de base des CNT. Un feuillet de graphène est une molécule formée d'un réseau hexagonal d'atomes de carbone. Les CNT se présentent sous la forme d'un ou plusieurs feuillets de graphène enchevêtrés en un cylindre creux de quelques nanomètres ou dizaines de nanomètres de diamètre, et d'une longueur pouvant atteindre plusieurs dizaines de micromètres. De par ce rapport longueur/largeur de l'ordre de 1000, les CNT sont considérés comme des nanofibres. Néanmoins, un CNT est à distinguer d'une nanofibre de carbone, sans cavité centrale et non nécessairement constituée d'une seule molécule mais de plusieurs brins de graphite multi-feuillets (Kayat et al. 2011).

Les CNT sont généralement classés suivant trois catégories en fonction du nombre de feuillets de graphène, caractéristique étroitement liée à leur diamètre (**Figure 2**):

- SWCNT : nanotubes de carbone simple-feuillet « Single-Walled Carbon Nanotubes »
- DWCNT : nanotubes de carbone double-feuillets « Doubled-walled Carbon Nanotubes »
- MWCNT : nanotubes de carbone multi-feuillets « Multi-Walled Carbon Nanotubes ».

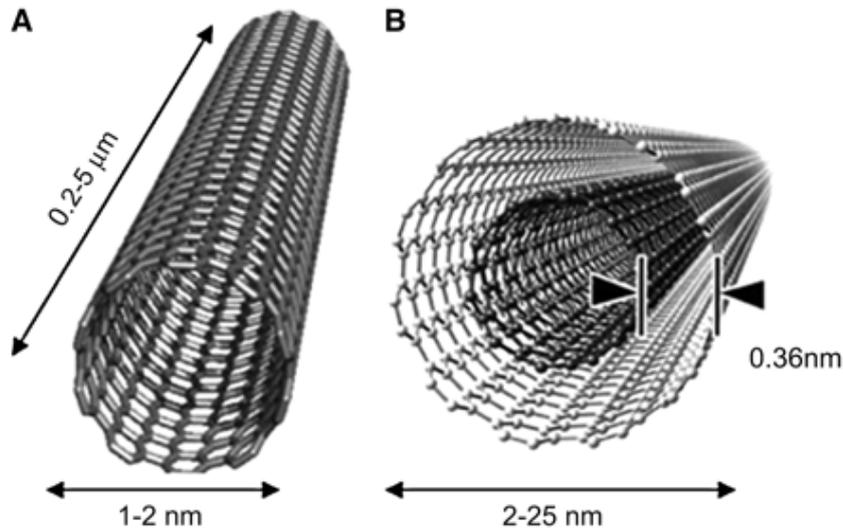


Figure 2 : Schéma de nanotube de carbone simple-feuillet (A) et double-feuillet (B) avec des dimensions spécifiques (Reilly 2007)

D'autre part ces tubes peuvent être classés en fonction de leur chiralité (**Figure 3**) : structures non chirales en « armchair », en « zigzag », ou structure chirale. Les structures chirales se reconnaissent par l'absence de symétrie miroir. En **Figure 4** sont représentées schématiquement ces différentes conformations de CNT en fonction de l'enroulement du feuillet de graphène. Le vecteur orthogonal à l'axe d'enroulement du tube est appelé \vec{C}_h . Il s'agit du vecteur chiral, dont la valeur est donnée par l'**Équation 1**.

$$\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2 \quad \text{Équation 1}$$

Avec \vec{a}_1 et \vec{a}_2 les vecteurs unitaires hexagonaux et (n,m) les indices de Hamana. Ces indices de Hamana permettent d'indiquer la chiralité des CNT de manière simplifiée (Belin & Epron 2005) :

- (n,n) : « armchair » correspond à un angle chiral de 30°
- (n,0) : « zig-zag » correspond à un angle chiral de 0°
- (n,m) : structure chirale, avec un angle chiral entre 0 et 30° .

Ces conformations leur confèrent des propriétés différentes, en particulier au niveau de la conductivité. Les CNT définis par des indices tels que $|n-m| = 3q$ sont métalliques, et ceux pour qui $|n-m| = 3q \pm 1$ sont semi-conducteurs (q étant un entier) (Belin & Epron 2005).

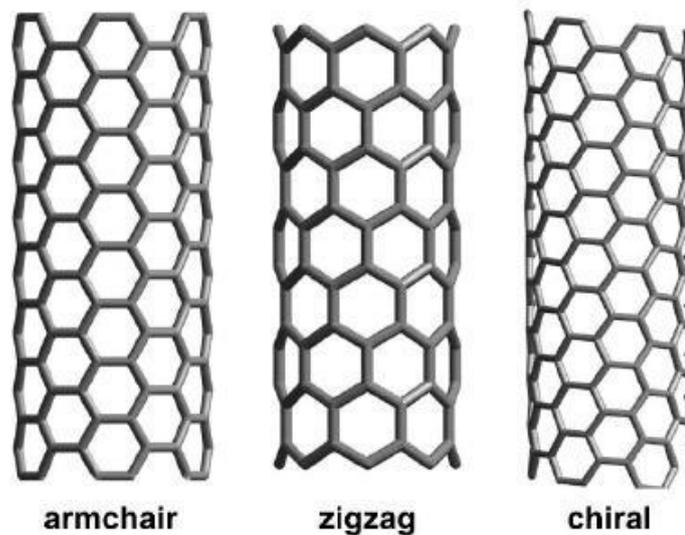


Figure 3 : Schéma des différentes chiralités possible d'un nanotube (Grady 2002)

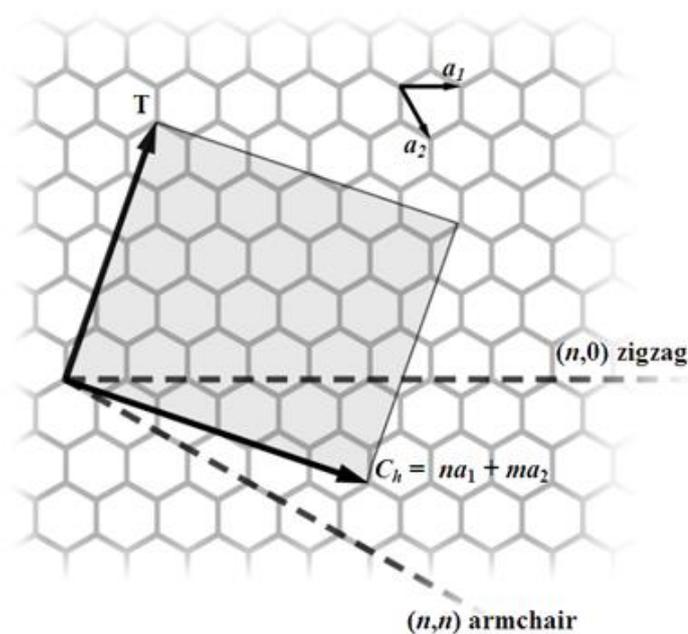


Figure 4 : Schéma de l'enroulement du feuillet de graphène en fonction de la chiralité des nanotubes de carbone. T : axe du tube, a_1 , a_2 : vecteurs unitaires.

D'autres différences de structures peuvent apparaître dès la production des nanotubes : ouverture du tube aux extrémités, degrés de cristallinité inégaux avec présence de carbone amorphe, et défauts de surface. Ces singularités peuvent altérer les propriétés physico-chimiques des CNT, et de ce fait modifier les interactions avec leur environnement. La structure des CNT est très stable mais nous verrons en partie III qu'il est possible d'influer sur le taux de défauts de surface par des traitements chimiques ou physiques.

I.2.2. Production

Il existe différents procédés de synthèse permettant d'obtenir des CNT, même si une seule (la technique CVD) est majoritairement utilisée à l'échelle industrielle (Ricaud et al. 2008; Shvedova et al. 2009) :

- Arc électrique : Il s'agit du procédé utilisé par Sumio Iijima (1991) lors des premières études sur les CNT. Un arc électrique créé entre deux électrodes de graphite permet de former, sous hélium et en présence de catalyseurs métalliques (cobalt ou nickel), un plasma sur l'anode engendrant sur la cathode un dépôt contenant des CNT.

- Ablation laser : Dans cette méthode de synthèse, une seule électrode de graphite est utilisée, toujours en présence de cobalt ou nickel. Un laser de forte énergie sublime le graphite ou l'expulse en petits agrégats atomiques qui vont former des CNT.

- Réacteur solaire : Cette technique, proche de la précédente, utilise l'énergie solaire concentrée pour sublimer le graphite.

- « Carbon Vapour Deposition » (CVD) : La technique de synthèse CVD utilise des catalyseurs métalliques (Fe, Co, Ni, Al, Y, etc.) permettant l'activation de la formation des CNT à température moyenne (500-1000°C) à partir d'un gaz riche en carbone (monoxyde de carbone ou hydrocarbure) (Ricaud et al. 2008). Cette méthode peut être transposée à l'échelle industrielle avec un bon contrôle des caractéristiques du produit. Deux procédés sont communément utilisés à large échelle : HIPco, et CoMoCAT. Dans le procédé HIPco, les catalyseurs sont sous forme de nanoparticules dispersées, alors que le procédé CoMoCAT utilise un support catalytique sur lequel les CNT vont se former de façon ordonnée.

Les catalyseurs métalliques utilisés pour toutes ces méthodes peuvent se retrouver inclus dans la structure finale des CNT. On les appelle alors des impuretés catalytiques. Divers procédés de purifications postproduction permettent d'en réduire leur proportion.

Depuis les années 1980 où les premiers CNT ont été commercialisés, le marché s'est surtout développé pour les MWCNT, moins contraignant à produire que les SWCNT. Les caractéristiques spécifiques de ces derniers rendent difficile la production de poudre des SWCNT avec une pureté satisfaisante. Le marché européen se partage aujourd'hui entre deux grands producteurs : Arkema (France), et Nanocyl (Belgique), et deux producteurs à plus faible échelle : Thomas Swan (RU), et Rosseter (Chypre) (Lacour et al. 2012). Les efforts se concentrent actuellement sur la recherche et le développement, et de nombreuses applications seraient amenées à voir le jour dans les prochaines années faisant accroître le marché. La capacité mondiale, passée de 996 tonnes en 2008 à 4065 tonnes en 2010, devrait atteindre 12 300 tonnes en 2015. La production réelle cependant n'était que de 340 tonnes en 2008, et

d'environ 710 tonnes en 2010 (435 millions \$ de chiffre d'affaire). Selon les prévisions de l'iRAP (Innovative Research and Products Inc.), elle devrait elle aussi augmenter pour atteindre 9 300 tonnes en 2015 (soit 1,3 milliards de \$) (iRAP 2011).

Cependant, ces chiffres sont à prendre avec précaution, car après un essor extrêmement rapide, l'industrie des CNT ralentit aujourd'hui sa croissance. Bayer Material Science a ainsi fermé son usine Allemande en mai 2013 (Anon 2013). Les raisons invoquées sont d'une part, la concurrence asiatique (CNano Technology, et Showa Denko par exemple), et d'autre part le développement plus lent que prévu des applications des CNT avec une certaine appréhension des nanotechnologies de la part du public européen. Patrick Thomas, le PDG de Bayer Material Science reste toutefois convaincu que les CNT ont un énorme potentiel.

1.2.3. Propriétés et applications

Les nanotubes de carbone intéressent fortement les industriels grâce à leurs propriétés physico-chimiques exceptionnelles (**Tableau 1**) leur promettant des applications dans des domaines aussi variés que la science des matériaux, la microélectronique, ou la médecine (Baughman et al. 2002; De Volder et al. 2013).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques et propriétés des nanotubes de carbone (d'après Baughman et al. 2002; Ricaud et al. 2008; Laurent et al. 2010)

	SWCNT	MWCNT
Diamètre	0,4 – 3 nm	1,4 – 100 nm
Longueur	1 à plusieurs μm	1 μm – 1cm
Aire spécifique	1300 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$	Quelques centaines de $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$
Densité	0,5-4 $\text{kg}.\text{m}^{-3}$	0,5-3 $\text{kg}.\text{m}^{-3}$
Limite d'élasticité	45 GPa ou 37 GPa	150 GPa
Module d'Young	1-1,4 TPa	1,4-1,6 TPa
Module de cisaillement	0,27 TPa	0,44-0,47 TPa
Module de flexion	0,2-1,2 TPa	3-30 TPa
Stabilité thermique	< 2100	> 3200
Conductivité thermique	6000 $\text{W}.\text{mK}^{-1}$	< 2000 $\text{W}.\text{mK}^{-1}$
Capacitance	$\approx 180 \text{ F}.\text{g}^{-1}$ 15 – 200 $\text{F}.\text{g}^{-1}$	$\approx 102 \text{ F}.\text{g}^{-1}$

Ainsi, à section équivalente, les CNT sont de 100 à 200 fois plus résistants que l'acier pour un poids 6 fois moindre, leur dureté peut être supérieure à celle du diamant, avec néanmoins une bonne résistance à la déformation et une bonne flexibilité. Les CNT sont donc un choix de prédilection pour l'élaboration de nouveaux matériaux composites qui soient à la fois légers et résistants, avec des applications :

- dans le sport de haut niveau (ex : Babolat® NS™ Tour Tennis Racket, BMC Racing Fourstroke FS01, Nitro Hockey Sticks, voir l'inventaire du projet PEN (PEN The Project on Emerging Nanotechnologies 2014)
- dans l'aéronautique (ex : Giles G-200 Aircraft, mais les premiers essais ne se révèlent pas aussi satisfaisants qu'attendus (Fery 2013)),
- ou bien dans les énergies renouvelables (ex : brevet sur pâles d'éoliennes Jensen & Erichsen 2008).

La conductivité thermique des SWCNT dépasse celle des meilleurs conducteurs connus jusqu'alors : argent, cuivre, et diamant (6000 W.mK^{-1} face à 1000 à 2600 W.mK^{-1}). Par ailleurs les MWCNT ont une stabilité thermique supérieure à 3200 K . Plusieurs produits utilisant ces propriétés ont déjà été mis sur le marché : enduit Thermocyl™ de Nanocyl, ou revêtements pour textile retardateur de flamme par exemple (US EPA 2012).

Selon leur chiralité, les CNT peuvent être isolants, semi-conducteurs, ou à comportement métallique. Dans ce dernier cas, leur capacité de transport de densité de courant peut atteindre $10^{10} \text{ A.cm}^{-2}$ pour les SWCNT, c'est-à-dire deux ordres de grandeurs supérieurs aux métaux classiques. De plus, à leur extrémité, les CNT sont capables d'émettre des électrons par effet tunnel de façon très localisée. C'est pourquoi, d'après l'étude de l'iRAP (2011), les SWCNT pourraient remplacer le silicium comme matériau de base des microprocesseurs électroniques (applications pour les batteries de téléphone portable, et voitures électriques).

La surface des CNT peut être fonctionnalisée en y liant des groupements chimiques d'intérêt de manière covalente ou non-covalente. Le cœur des CNT peut aussi être fonctionnalisé en les utilisant comme des capillaires nanométriques. La fonctionnalisation des CNT décuple et affine les applications potentielles de ces nanomatériaux. La fonctionnalisation de groupements acides en surface permet par exemple de rendre les CNT plus hydrophiles (Boehm 2002, voir aussi III.3.4. Fonctionnalisation de surface). La fonctionnalisation de protéines ou oligonucléotides ouvre la voie à de nombreuses applications en médecine (Bianco et al. 2005; Singh et al. 2012). La conception de nano-vecteurs à l'aide de CNT notamment est très prometteuse. Ces systèmes nanométriques seraient composés d'un nanotube de carbone sur lequel sont greffés des récepteurs spécifiques, un principe actif, un fluorophore, etc. Ils auraient la capacité d'atteindre une cible d'intérêt et d'y délivrer le principe actif de façon très locale, ou de permettre des analyses en imagerie nucléaire bien plus précises (Jain et al. 2011). D'autres applications en

médecine comme film antimicrobien, support pour culture de cellules souches ou biosenseurs sont à l'étude (Mundra et al. 2014).

I.3. Risques liés aux nanotubes de carbone

I.3.1. La question du risque

Malgré ce développement industriel prometteur et de leur impact économique, il est urgent de bien appréhender les effets potentiels des nanotubes de carbone sur la santé et l'environnement. En effet de par cet essor, les situations d'exposition aux CNT se multiplient. Le public à risque est constitué majoritairement des chercheurs et des opérateurs industriels (ambiances professionnelles) dans un contexte incertain de réglementation. Dans un second temps, le relargage possible de CNT par les produits finis, notamment en fin du cycle de vie du produit, et la dispersion dans l'environnement peut prendre de l'ampleur et concerner le grand public. Il est donc indispensable de déterminer le risque associé à l'exposition aux nanotubes de carbone, afin de pouvoir mettre en place si nécessaire une base réglementaire et des mesures de sécurité adaptées.

Le risque se définit de la manière suivante :

$$\text{Risque} = \text{Danger} \times \text{Probabilité d'occurrence du risque} = \text{Toxicité intrinsèque} \times \text{Exposition}$$

L'évaluation du risque se réalise donc en deux temps : d'une part l'évaluation du danger couru donc de la toxicité des CNT sur l'homme ou l'environnement, et d'autre part l'évaluation de la probabilité d'occurrence de ce risque, c'est-à-dire l'évaluation de l'exposition humaine ou environnementale. La démarche « classique » d'évaluation du risque utilise la toxicologie *in fine* pour expliquer des troubles de santé qui ont déjà été liés à une substance spécifique à la suite d'études épidémiologiques. Des valeurs d'exposition limite sont ainsi définies *a posteriori*. La démarche actuelle consiste à utiliser la toxicologie de manière préventive voire prédictive en amont ou en parallèle de la mise sur le marché de la substance concernée. C'est dans ce contexte que se situe l'objet de cette thèse.

I.3.2. Exposition

I.3.2.1. Situations et voies d'exposition

Comme mentionné précédemment, il existe diverses situations d'exposition aux nanoparticules (**Figure 5**). Concernant les CNT, les études se concentrent essentiellement sur l'exposition professionnelle. De par la manipulation de quantités importantes de CNT sous forme de substances pulvérulentes (pouvant éventuellement former des aérosols), les professionnels sont en effet pour l'instant plus susceptibles d'être au contact d'une quantité

significative de CNT par rapport au grand public. Dans les rares produits actuellement disponibles sur le marché, les CNT sont enrobés dans une matrice minérale ou organique limitant leur relargage dans l'environnement. Le relargage de CNT après vieillissement du produit est néanmoins un point crucial dont l'étude commence à se développer (Hirth et al. 2013; Nowack et al. 2013). L'exposition environnementale fait l'objet d'études complémentaires, avec également une attention particulière portée sur les rejets professionnels.

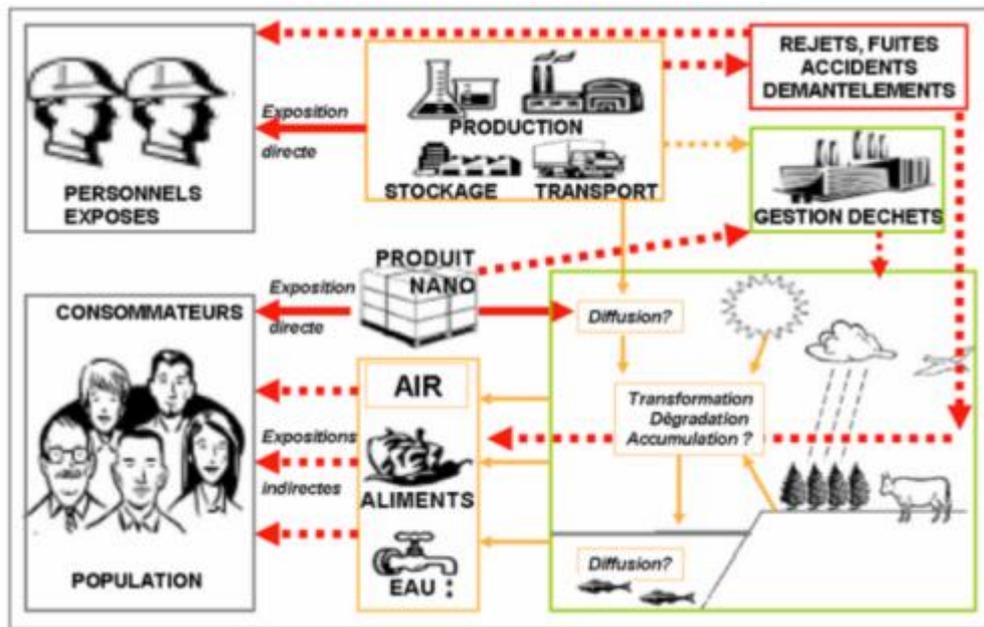


Figure 5 : Situations d'expositions au regard du cycle de vie de nanoparticules (source www.nanosmile.org)

L'exposition aux CNT peut se faire par différentes voies : injection, ingestion, contact cutané, et inhalation. L'injection ou voie parentérale et le passage rapide dans la circulation sanguine qui en découle ne concerne *a priori* que les cas où les CNT sont injectés volontairement dans un cadre médical (utilisation type nano-vecteur, au stade de la recherche actuellement). Les études nécessaires à ce type d'utilisation, déterminant la balance risque/bénéfice, sont bien encadrées d'un point de vue législatif et diffèrent des études plus fondamentales de toxicologie qui leur sont néanmoins complémentaires. L'ingestion d'aliments pollués par des CNT, suite par exemple à l'utilisation de CNT dans le packaging alimentaire, pourra conduire à une exposition par voie gastro-intestinale. Les phénomènes de clairance muco-ciliaire peuvent aussi entraîner le passage de particules de l'appareil respiratoire à l'appareil digestif au niveau du carrefour aérodigestif. La manipulation de poudres sans équipements de précaution ou malgré ceux-ci peut conduire à une exposition cutanée aux CNT. D'après l'étude de Maynard et al. (2004), 0,2 à 6 mg de SWCNT peuvent se retrouver sur chaque gant après une journée classique de manipulation dans une industrie productrice. L'utilisation possible de CNT dans des produits cosmétiques type crèmes ou produits de soin

capillaire (Huang et al. 2007) conduirait également à une exposition par contact cutané. Enfin, les CNT, du fait de leur faible taille et densité, sont facilement aérosolisables et peuvent se retrouver en suspension dans l'air augmentant ainsi les risques d'exposition par contact cutané (visage non protégé) mais aussi par inhalation. L'inhalation par voie aérienne est de ce fait la voie d'exposition la plus importante pour les opérateurs.

I.3.2.2. Exposition par inhalation

De par leur diamètre aérodynamique de l'ordre de la centaine de nanomètres, les CNT sont classés parmi les fibres inhalables. Le diamètre aérodynamique d'une fibre est calculé comme le diamètre de la sphère de densité 1 de volume équivalent. En fonction de celui-ci, des modèles mathématiques permettent de prédire le dépôt des particules ou des fibres dans les différentes régions du tractus respiratoire (**Figure 6**). Cependant, ces modèles restent perfectibles, notamment car ils ne considèrent que des particules sphériques et ne prennent pas en compte les différents caractères hygroscopiques ou charges électriques. Schématiquement, les grosses particules de plus de 1 μm de diamètre aérodynamique restent dans la zone extra-thoracique d'où elles sont éliminées en partie par les mécanismes de défense physiques : toux, muqueuses (barrières mécaniques naturelles), appareil muco-ciliaire, ou chimique : solubilité dans les mucus. Les particules plus fines, de 10 à 100 nm, pénètrent dans la zone trachéo-bronchique mais ne s'y logent pas, une majorité se retrouvant en effet déposée dans la zone alvéolaire.

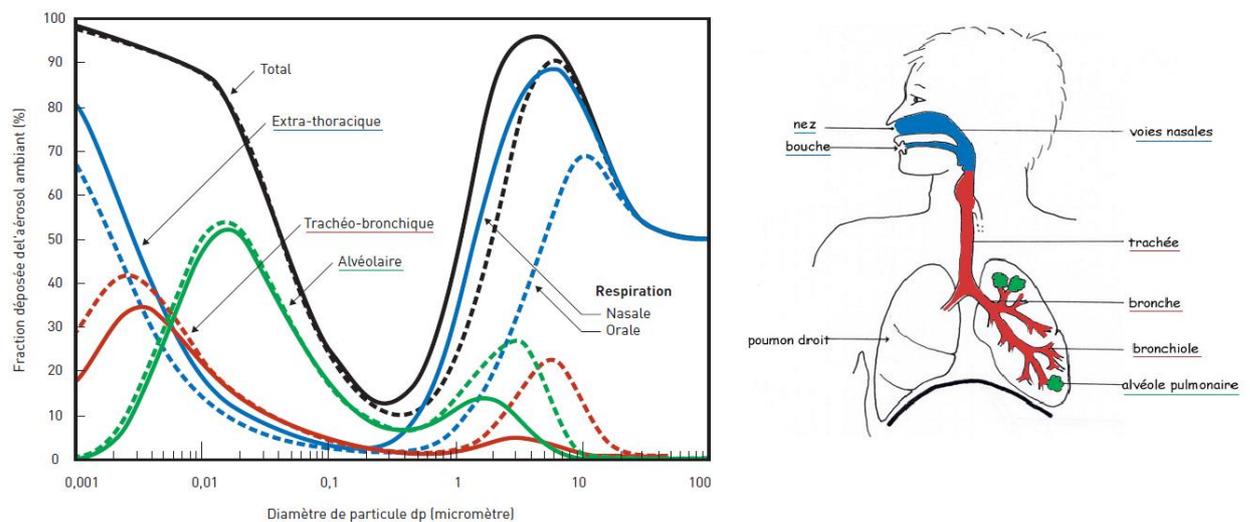


Figure 6 : Pourcentage des particules déposées dans les différentes régions de l'appareil respiratoire en fonction de la taille des particules sphériques et non-agglomérées considérées (d'après Witschberg & Fabriès 2005)

Hervé-Bazin (2006) a recensé cinq mécanismes physiques principaux permettant un dépôt des nanoparticules au plus profond des voies respiratoires, c'est-à-dire au niveau des alvéoles pulmonaires (**Figure 7**) :

- Impaction : inertie des particules suivant le mouvement de l'air,
- Sédimentation : action de la gravité, augmente avec la densité et la taille des particules,
- Interception : contact avec la paroi, particulièrement importante pour les fibres et agglomérats,
- Diffusion : due aux mouvements Brownien, donc aléatoire,
- Effet électrostatique : pour les particules chargées, répulsion envers les particules chargées de la même manière, et attraction envers les parois de charge contraire.

L'étude de Bakand et al. (2012) précise cependant que seule la diffusion et les effets électrostatiques contribuent au dépôt des nanoparticules, leur taille étant trop faible pour que les autres mécanismes aient un effet. Cette contradiction souligne les difficultés actuelles à comprendre les mécanismes spécifiques de déposition des nanoparticules, et l'intérêt d'en améliorer la compréhension par d'autres études de cartographie de dépôt.

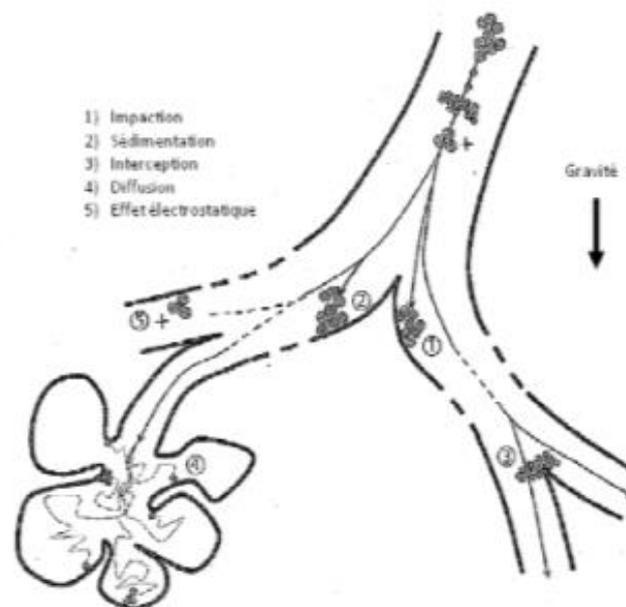


Figure 7 : Différents mécanismes de dépôts des particules inhalées dans les voies respiratoires (Hervé-Bazin 2006)

Considérant les nanotubes, leur propension à l'agrégation diminue la fraction inhalable mais des petits agrégats ou agglomérats ainsi que des tubes isolés peuvent atteindre la région alvéolaire. Cette région constitue la plus importante surface d'échange entre l'environnement extérieur et le corps humain (pour un adulte la surface potentielle d'échange est comprise en moyenne entre 100 et 150m²). Les CNT sont alors susceptibles de poursuivre leur

cheminement après translocation de la barrière épithéliale représentée par la barrière alvéolo-capillaire (Deng et al. 2007; Pauluhn 2010). Ils atteindraient alors la circulation sanguine systémique et pourraient diffuser dans tous les compartiments de l'organisme (Oberdörster et al. 2005). Il est donc nécessaire d'étudier d'une part la biodistribution des CNT, et d'autre part les effets potentiellement toxiques des CNT dans les différents compartiments atteints, en commençant par la zone alvéolaire.

I.3.2.3. Exposition professionnelle

A ce jour, très peu de données sont disponibles sur l'exposition aux nanotubes de carbone en situations réelles. Les difficultés rencontrées lors de la mise en place d'études des émissions et de l'exposition en milieu professionnel sont en effet nombreuses (Maynard et al. 2004; Witschberg et al. 2012) :

- Les nanomatériaux et en particulier les CNT restent encore mal caractérisés du fait de leur multiplicité de forme, de taille, de propriétés physico-chimiques,
- Les coopérations nécessaires entre industriels ou laboratoires de recherche et les spécialistes de la mesure des expositions au poste de travail sont difficiles à mettre en place, et nécessitent la coopération active des industriels.
- Les résultats de ces études sont difficiles à publier, d'où un accès restreint de la communauté scientifique à ces données.
- Il y a une absence de consensus concernant les critères de métrologie.
- Les techniques et appareils restent peu optimisés, même si l'instrumentation se développe.
- Les méthodes de mesure aux postes des opérateurs ne sont pas harmonisées.
- La distinction entre l'aérosol cible et bruit de fond est potentiellement difficile.

Comme fréquemment lorsqu'il est question de nanomatériaux, il serait nécessaire de mettre en place un système spécifique de standardisation internationale. En 2011, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) a lancé un programme d'étude concluant à la faisabilité d'un dispositif de surveillance des expositions professionnelles basé sur un système de déclaration (Boutou-Kempf 2011). En 2012, dans le cadre du plan Nano-INNOV, l'INRS (l'Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles), l'INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des risques) et le CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives) ont coopéré afin de mettre au point une approche harmonisée pour la caractérisation des émissions et des expositions professionnelles aux nanomatériaux (Witschberg et al. 2012). La démarche proposée est constituée de cinq phases évaluant tout d'abord, la nécessité et faisabilité d'une campagne de mesurage en fonction de la situation et des données accessibles, et proposant par la suite deux niveaux de caractérisation : de base pour une étude interne, et expert pour une étude réalisée par des professionnels de la métrologie.

Concernant les études déjà disponibles, il est difficile de comparer leurs résultats du fait des différences sur les activités étudiées et méthodes employées. Cependant, les études concluent en majorité à l'émission effective d'aérosols lors de la manipulation de CNT en poudres sèches et lors de la sonication des suspensions liquides (**Tableau 2**). La première étude sur ce sujet (Maynard et al. 2004) soulignait ainsi la possibilité d'une exposition par voie aérienne (SWCNT : $0.7-53\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ d'air) et d'une exposition cutanée (SWCNT : 0,2 à 6 mg par gant et par jour). Johnson et al. (2010) se sont quant à eux penchés sur les différences d'émissions entre MWCNT bruts et MWCNT fonctionnalisés avec des groupements hydroxyles en surface. L'activité produisant une émission maximale de nanoparticules semble dépendre des caractéristiques physico-chimiques des CNT (pesée pour MWCNT bruts et sonication pour MWCNT fonctionnalisés). Les tailles des particules émises sont néanmoins identiques : une majorité à 300 nm de diamètre aérodynamique et un second groupe à 500 nm. Cependant si la plupart des études s'accordent pour conclure à la production de nanoparticules, peu ont détecté la présence de CNT dans ces aérosols, et aucune n'a différencié les CNT des autres nanoparticules de carbone. La question du bruit de fond est critique : de très nombreuses nanoparticules sont présentes naturellement dans l'air, ou sont issues de l'industrie, rendant ardue la détection spécifique des nanoparticules d'intérêt. D'après Möhlmann (2014) ce bruit de fond est estimé par exemple à $10\,000$ particules. cm^{-3} dans un bureau fermé, et $700\,000$ particules. cm^{-3} dans un aéroport. Kuhlbusch et al. (2011) ont proposé quatre approches basiques pour essayer de contrer ce problème : séries temporelles, approche spatiale, approche comparative avec/sans nanomatériaux étudiés, et analyses chimiques ou morphologiques des aérosols. Johnson et al. (2010) combinent ainsi l'approche comparative avec une détection des particules naturelles ou industrielles par microscopie électronique à transmission (MET) au sein d'un laboratoire de recherche manipulant des nanomatériaux de carbone. Lee et al. (2010) ont effectué de la même manière des mesures peu avant l'étude proprement dite, mais ont souligné la complexité d'un tel doublement des mesures combiné à la nécessité de stopper la chaîne de production.

L'exposition professionnelle est donc, aujourd'hui, difficilement quantifiable en routine mais les premières études alertent toutefois sur la forte probabilité d'exposition nécessitant la mise en place de mesures de protection suivant le principe de précaution.

Tableau 2 : Synthèse des études sur l'exposition aux nanotubes de carbone.

Etudes		Particules distinguables du bruit de fond			Remarques et Interprétations des auteurs	
Publication	Type d'activités étudiées	Nombre de particules	Concentration massique	Description	Autres sources d'aérosol	Conclusion
Maynard et al. 2004	Production (échelle de la recherche), manipulation de SWCNT en poudre en sortie de production	Non mesuré	0,7-53 $\mu\text{g.m}^{-3}$	SWCNT, amas de fibres compacts	Aspirateur : pas d'association avec des structures type SWCNT.	Exposition aux CNT dans les laboratoires de production.
Han et al. 2008	Production (échelle de la recherche), manipulation de CNT en poudres sèches	De 173-194 à 0,018-0,05 MWCNT.cm ⁻² après mesures de protection	Jusqu'à 200 $\mu\text{g.cm}^{-3}$ (noir de carbone)	Diamètre moyen 52-56 nm, longueur 1,5-1,8 μm . Distribution unimodale à 300 nm. En majorité particules métalliques issues des catalyseurs.	Mélangeur pompe à huile : associée à des fibres de chrysolite (amiante).	Particules respirables émises, associées à une détection de noir de carbone. Efficacité des mesures de protection (diminution de 172,9- 193,6 à 0,018–0,05 particules.cm ⁻³)
Bello et al. 2008	Production (échelle de la recherche), récupération des CNT après production (détachement des tubes)	Non mesuré	/	Pas d'indication de structures type CNT. Distribution bimodale 10 et 100 nm.	/	Pas d'émission de CNT détectée.
Bello et al. 2009	Recherche sur les composites à base de CNT, manipulations sur CNT en poudres et dispersés dans un solvant	1,7104 CNT.cm ⁻³	8,38 mg.m ⁻³	Fibres aux diamètres moyens de 5-20 nm, longueurs de quelques μm . Pas de CNT individualisé, mais encapsulation époxy.	Non	Récupération humide des CNT diminue la concentration en particules mais augmente leur distribution en taille.

Lee et al. 2010	Etude comparative de 7 usines productrices de CNT (CVD)	Non mesuré	0,03-0,29 mg.cm ⁻³	Amas de particules métalliques issues des catalyseurs. Pas de structure type CNT ou de noir de carbone. Particules de 20-50 nm et 120-300 nm dégagée après sonication.	/	Emission principale après ouverture de la chambre de production, pas de CNT détectée, sous les normes coréennes pour l'amiante et le noir de carbone (3,5 mg.cm ⁻³ ; 0,1 fibre.cm ⁻³).
Johnson et al. 2010	Pesée et sonication de MWCNT bruts et fonctionnalisés MWCNT-OH, en poudres sèches et dispersés dans milieu avec matière organique	A 300 nm >120 000 part.L ⁻¹ pour MWCNT, > 140 000 part.L ⁻¹ pour MWCNT-OH	/	MWCNT et MWCNT-OH en agglomérats majoritairement, mais détection de structure tubulaire après sonication des MWCNT. Majorité de particules à 300 nm, puis à 500 nm.	/	Activité la plus exposante : sonication de MWCNT-OH (stoppée par une enceinte close). Pire scénario possible : détection au plus près de la source.
Dahm et al. 2012	Etude comparative de 6 usines productrices ou utilisatrices de MWCNT et SWCNT	3,2.10 ³ – 1,23.10 ⁴ particules/cm ³ Bruit de fond : 2,9.10 ³ – 8,9.10 ³ particules/cm ³	0,011-0,107 mg.m ⁻³ (nanoparticules) Non différentiable du bruit de fond pour la plupart	Pas d'observations.	/	Il n'est pas possible de distinguer une tendance significative à l'émission de CNT, toutefois un doute est émis sur la fiabilité des appareils de mesure.
Erdely et al. 2013	Production de 8 MWCNT, détecteur dans la zone personnelle de respiration des opérateurs. 5 MWCNT de Dahm et al. 2012.	Non mesuré	De non-détectable à 79,6 µg.m ⁻³ (moyenne 10,6 µg.m ⁻³) de carbone élémentaire. Equivalent 4,07 µg/jour/humain	Agglomérats de CNT	/	Exposition aux CNT dans les laboratoires de production. La dose mesurée correspond au carbone élémentaire et non au carbone provenant uniquement des CNT.

I.3.3. Réglementation et démarches de prévention du risque lié aux nanotubes de carbone

I.3.3.1. Réglementation française

Les difficultés de normalisation pour les études épidémiologiques et toxicologiques freinent la mise en place d'une réglementation spécifique aux nanomatériaux. Celle-ci est fortement attendue en particulier par les associations et organisations non-gouvernementales. Cependant au vu des connaissances actuelles du risque et du manque de consensus sur les définitions, les doses concernées, il semble difficile de produire actuellement une réglementation pertinente et exhaustive.

Des lois européennes seront amenées à voir prochainement le jour suite à la formation de deux comités de l'Union Européenne : le Comité scientifique pour les risques émergents et nouvellement identifiés, et le Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs. Dans son livre, Stéphanie Lacour (2012) fait l'inventaire des réglementations s'appliquant aux CNT en France :

- REACH (« Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances », cadre réglementaire de gestion des substances chimiques) (CE N°1907/2006) : Deux cas sont possibles pour les nanomatériaux : enregistrement en tant que nouveau matériau avec apport des données nécessaires, ou déclaration du nanomatériau comme rattaché à la substance brute (graphite ou carbone pour les CNT) avec données sur le nanomatériau incluses dans le dossier de déclaration. Ce règlement s'applique aux producteurs et utilisateurs de plus d'une tonne de matériau par an, mais si les risques sont avérés et les CNT considérés comme des substances extrêmement préoccupantes, la condition de seuil de production ou d'importation disparaît.
- Grenelle I, et II (N° 2009-967; N° 2010-788): En France, la loi dite Grenelle I instaure une obligation de déclaration mais sans précisions d'applications. La loi dite Grenelle II confirme cette obligation de déclaration dans le respect du secret industriel, et l'élargit aux substances incluses dans des produits déjà soumis à une autorisation préalable de mise sur le marché.
- Code du Travail : Il fait porter la responsabilité de la sécurité et de la gestion des risques sur l'employeur. Des fiches de sécurité doivent ainsi être réalisées pour tout matériau utilisé à plus de 1 tonne par an, ou pour les substances et préparations dangereuses. Les informations concernant la sécurité doivent être communiquées au personnel. Le Haut conseil de la santé publique (HCSP) et l'INRS recommande dans ce cadre un affichage spécifique de signalisation des nanomatériaux. La

prévention face aux risques connus doit être appliquée. Face aux risques inconnus, c'est le principe de précaution qui s'applique.

- Code de l'Environnement, Principe de précaution: Le principe de précaution est destiné aux situations de risque inconnu où « *l'absence de certitudes, compte-tenu des connaissances scientifiques et techniques du moment, ne doit pas retarder l'adoption de mesures de prévention* » Article L. 200-1 de la loi Barnier du 2 février 1995, codifié aux articles L210-1 et L310-2 du code de l'environnement. Les destinataires de ce principe inscrit dans la convention française sont les autorités administratives. Le risque ne doit pas empêcher les études autour des nanomatériaux et leur utilisation industrielle, mais en posant les mesures de sécurité maximales adaptées afin de garantir une exposition ALARA (« as low as reasonably achievable », aussi faible que possible). Toutefois l'article L523-4 (Anon 2010) prévoit une déclaration des substances nanoparticulaires sans en préciser les conditions d'application.

Plus récemment, le décret n° 2012-232 (17 février 2012) confirme l'obligation des entreprises ou laboratoires de recherche à déclarer annuellement toute production ou importation de substances à l'état nanoparticulaire dès 100 g de substance. L'Anses a fourni en Novembre 2013 un premier rapport à l'issue des déclarations de ces substances (Anses 2013). Sur les 500 000 tonnes de substances à l'état nanoparticulaire déclarées, 56% ont été produites en France et les 44% restant ont été importées. Il est à noter que contrairement à ce qui était attendu, aucune mention n'est faite des nanotubes de carbone. Pourtant plus de 1000 tonnes de noir de carbone ont été recensées, de 1 à 10 t de graphite, et de 1 à 10 kg de fullerènes. Une très petite quantité (0,1-10 kg) de carbone a également été déclarée sans autre information sur leur morphologie. De la même manière, aucune donnée n'a été fournie sur le nano-argent. Il est assez étonnant de constater que deux des nanomatériaux pour lesquels la recherche en toxicité est la plus dynamique n'aient finalement fait l'objet que de très peu de déclarations en France. Une des explications, est la considération des CNT non comme un produit fini, mais comme un composant d'un produit final non nanométrique, telles les pastilles Graphistrength® d'Arkema. De plus, cela souligne le manque de contrôles et d'évaluations spécifiques tant que la réglementation n'est pas clairement définie.

L'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, qui a fusionné avec l'Afssa en 2010 pour devenir l'Anses) a été saisie en 2007 afin d'expertiser l'évaluation des risques liés au Graphistrength® C100 produits par le producteur français Arkema. Un dernier rapport est sorti en mai 2014 (Anses 2014). Il fait malheureusement état de nombreuses lacunes dans les études présentées, avec des protocoles inadaptés ou insuffisants. Cela souligne bien l'écart existant entre la recherche actuelle sur la nanotoxicité et la réalité industrielle.

I.3.3.2. Prévention et protection

L'article L4121-2 du Code du Travail (2012) établit une démarche de prévention selon neuf principes généraux :

- « 1. Eviter les risques,
2. Evaluer les risques qui ne peuvent pas être évités,
3. Combattre les risques à la source,
4. Adapter le travail à l'homme [...],
5. Tenir compte de l'état d'évolution de la technique,
6. Remplacer ce qui est dangereux par ce qui n'est pas, ou moins dangereux,
7. Planifier la prévention [...],
8. Prendre des mesures de protection collective en leur donnant la priorité sur les mesures de protection individuelle,
9. Donner les instructions appropriées aux travailleurs. »

Certaines institutions internationales ont déjà proposé des valeurs d'exposition limite basées sur celles de l'amiante (**Tableau 3**). Pour la BSI (« British standard institution » institut britannique de normalisation) par exemple, la valeur proposée est identique à la valeur libératoire après un chantier de désamiantage. Les CNT ont en effet une analogie de forme avec les fibres d'amiante, et les conséquences sur la santé humaine peuvent être en partie également identiques comme le montrent les premières études de toxicologie pulmonaire. Toutefois, ces valeurs limites devront être réévaluées au fur et à mesure de la parution de nouvelles données de toxicologie spécifiques aux CNT.

Dans l'attente de données toxicologiques plus complètes, et donc de limites d'exposition professionnelles en accord avec la législation française et européenne, il est préconisé de rechercher le niveau d'exposition le plus faible possible et de mettre en place des mesures de prévention (Ricaud 2012). Afin de réduire les risques à la source, les procédés peuvent être optimisés pour diminuer la quantité de nanomatériaux nécessaires, limiter leur utilisation sous forme de poudre (privilégier les agglomérats, suspensions liquides, ou incorporation dans des matrices) et prévenir au maximum tout risque d'explosion, incendie ou accident. Les mesures de préventions collectives passent généralement par l'aménagement des espaces de travail et des laboratoires : signalisation, accès réglementé, sas avec équipements de protection individuelle, ventilation générale ou Sorbonne avec filtres adaptés (filtres à fibres à air à très haute efficacité de classe supérieure à H13 recommandés), ou boîte à gants, facilité de nettoyage, système de conditionnement et gestion des déchets avec traçabilité. Les procédures adaptées devront ainsi être rédigées et communiquées aux salariés, et des entraînements devront être dispensés si

nécessaire. La signalisation n'est pour l'instant pas réglementée, l'INRS propose toutefois un pictogramme spécifique aux nanomatériaux (**Figure 8**). Les équipements de protection collective sont à utiliser en priorité. Ils peuvent néanmoins être complétés par des équipements de protection individuelle. Il s'agit des appareils de protection respiratoire, des équipements de protection cutanée : combinaison (Tyvek® de type 5 conseillé), gants étanches et jetables, lunettes équipées de protection latérale, et éventuellement de manchettes et couvre-chaussures.

Tableau 3 : Valeurs d'exposition limites recommandées pour les CNT.

Date	Organisme	Valeur d'exposition limite
2007	BSI "British Standard Institution"	0,01 fibres.mL ⁻¹ air pour les CNT et nanofibres de carbone 0,001 fibres.mL ⁻¹ d'air si avérés cancérogènes, mutagènes ou reprotoxiques
2013	NIOSH "The National Institute for Occupational Safety and Health"	1,0 µg.m ⁻³ d'air, de carbone élémentaire pour une exposition professionnelle moyennée à 8 h par jour.
2011	IFA "Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung" Institut pour la santé et la sécurité au travail de l'assurance sociale allemande.	<20 000 fibres.cm ⁻³ , concentration en nombre, pour une période transitoire avant données complémentaires.

Il convient en outre d'adapter le suivi médical en fonction du contexte de risque. Du côté de la médecine du travail, il est primordial d'insister sur les risques mis en jeu, un bilan de référence au début de l'activité peut être proposé, ainsi qu'un suivi régulier. Du côté du salarié, il est de son devoir de reporter tout incident ou problème de santé rencontrés (NIOSH 2013; Ricaud 2012).

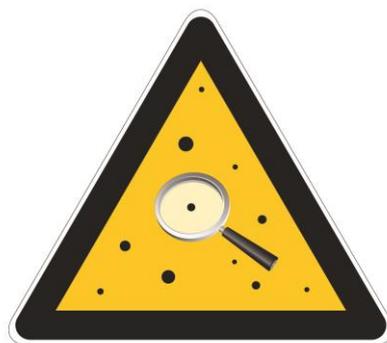


Figure 8 : Pictogramme « Risque d'exposition aux nanomatériaux » proposé par l'INRS (Ricaud 2012)

Après avoir eu un aperçu de l'exposition aux CNT et du contexte de réglementation mis en place pour la contrôler, nous allons nous intéresser dans les parties suivantes à l'étude de la toxicité des CNT.

II. Toxicité pulmonaire *in vivo* chez l'animal

L'évaluation de la toxicité pulmonaire des nanotubes de carbone est une problématique relativement récente. Les premiers résultats ont été publiés à partir de 2003 seulement pour les études *in vivo* comme pour les études *in vitro*. Ces études se sont concentrées sur l'identification de réponses biologiques spécifiques, ainsi que, plus récemment, sur la biodistribution des nanotubes de carbone après une ou plusieurs expositions aiguës ou chroniques chez le rat et la souris. Cependant, les études réalisées jusqu' alors sont peu comparables entre elles, d'une part, à cause des nombreuses différences de caractéristiques physico-chimiques des CNT étudiés, et d'autre part, à cause des disparités des modes opératoires utilisés :

- Exposition par instillation intra-trachéale, inhalation tête-nez, aspiration par voie pharyngée, injections intrapéritonéales ou intra-pleurales,
- Différences dans les doses, les durées et le nombre d'expositions, ainsi que les temps de latence entre les expositions,
- Différences d'exposition, de la durée de l'étude, et de la réponse biologique étudiée chez l'animal.

Cependant, si les résultats peuvent varier d'une étude à l'autre et qu'il convient de conserver une certaine prudence, la majorité des études ont conclu à l'apparition d'effets pathologiques en partie réversibles. Pour cet état de l'art, 22 études ont été répertoriées sur la base des rapports de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses 2012), du National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH 2013) et du Finnish Institute of Occupational Health (FIOH 2013). Quatre types de réponse biologiques ont fréquemment été observés : cytotoxicité, inflammation, formation de granulomes inflammatoires, et développement d'une fibrose. De façon plus ponctuelle, un stress oxydant a aussi été observé. De plus, de nombreuses études s'interrogent sur le devenir des CNT dans l'organisme notamment leur biodistribution, biopersistence et leur génotoxicité pouvant entraîner un risque oncologique à plus long terme.

II.1. Toxicité systémique et cytotoxicité

Lam et al. (2004) ont observé une toxicité systémique dès 7 jours avec mort de 3 souris sur 5 en réponse à une instillation intra-trachéale de 0,5 mg de SWCNT riches en Nickel et Yttrium (26%Ni et 5%Y respectivement). Ce type d'impuretés métalliques à un tel taux est très peu courant, et aucune mortalité n'a été observée avec des SWCNT purifiés ou riches en Fer (27%Fe). Sur les 14 études répertoriées pour cet état de l'art, aucune autre étude n'a fait état d'une mortalité causée par une exposition aux CNT, même si l'étude de Shvedova et al. (2008) a démontré une dégradation des fonctions pulmonaires avec des SWCNT riches en Fer (18%Fe) et l'étude de Mitchell et al. (2007) une dégradation des fonctions immunitaires avec des MWCNT purifiés.

A une échelle plus restreinte, l'exposition aux CNT a fréquemment été associée avec une mortalité cellulaire élevée ou cytotoxicité (Ellinger-Ziegelbauer & Pauluhn 2009; Muller et al. 2005; Murray et al. 2012; Osmond-McLeod et al. 2011; Pauluhn 2010; Porter et al. 2010; Shvedova 2005; Shvedova et al. 2008). Elle est caractérisée par une augmentation de l'enzyme LDH (Lactate Déshydrogénase) relarguée dans le LBA (lavage broncho-alvéolaire). Le LBA est réalisé au cours de la fibroscopie bronchique dont le premier objectif est l'appréciation macroscopique des différents étages de l'arbre bronchique, puis l'irrigation du poumon profond avec du sérum physiologique tiédi. Le liquide injecté est ensuite réaspiré (environ 100-150 cc) et permet l'obtention d'un liquide biologique riche en cellules (notamment macrophages alvéolaires libres en surface de la paroi pulmonaire) et en fluide intercellulaire. La présence de l'enzyme LDH dans le LBA extracellulaire indique une lyse cellulaire. L'étude de Warheit et al. (2004) a détecté une augmentation de la LDH uniquement à très forte concentration (5 mg.kg^{-1} intratrachéale) et à 24 h. Toutefois, une telle dose de CNT en instillation intratrachéale a aussi entraîné la mort de 15% des rats par blocage des voies respiratoires. L'étude d'Osmond-McLeod et al. (2011), en revanche, a détecté une absence totale de cytotoxicité pour des SWCNT en comparaison à des MWCNT. Cela confirme des données déjà établies de différence de toxicité entre SWCNT et MWCNT, indiquant une influence des paramètres physico-chimiques des CNT sur leur cytotoxicité.

II.2. Inflammation

L'inflammation est reconnue comme une des principales réponses à l'exposition aux CNT. Dans le panel des études réalisées *in vivo*, la majorité a observé une réponse inflammatoire (Osmond-McLeod et al. 2011; Pauluhn 2010; Porter et al. 2010; Shvedova 2005; Shvedova et al. 2008). Cependant, certaines études ont pondéré cette observation : pour Lam et al. (2004) l'inflammation observée suite à l'exposition de souris à des SWCNT était modérée ; pour les études de Schinwald et al. (2012), Poland et al. (2008), Muller et al. (2009), ou celle du FIOH (2013) la réponse inflammatoire dépendait des caractéristiques des MWCNT ; pour Tabet et al. (2011) elle était mitigée et dépendait de la chimie de surface des MWCNT ; pour Elgrabli et al. (2008) l'inflammation n'a été détectée que pour la plus forte dose de MWCNT et à 180 jours post-exposition uniquement. De la même manière, ni l'étude de Mitchell et al. (2007) ni celle de Mangum et al. (2006) ne font état d'une réponse inflammatoire pour des MWCNT et SWCNT respectivement avec des modes opératoires très différents.

Les techniques de détection peuvent varier mais reposent souvent sur une observation histologique, un dosage des protéines ou de cytokines spécifiques. Une augmentation de la cellularité dans le LBA, particulièrement des neutrophiles polynucléaires, est en effet un signal du processus inflammatoire. L'élévation de la quantité de protéines totales dans le LBA est un marqueur de la perte d'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire. Le dosage de cytokines pro-inflammatoires renseigne sur leur niveau de production et d'activation de la réponse pro-

inflammatoire. Les plus étudiées sont le TNF- α (Tumour Necrosis Factor α) ou les interleukines IL1- β ou IL6 produites par les macrophages. L'étude de Crouzier et al. (2010) conclut ainsi à un processus inflammatoire déclenché par des DWCNT alors que seule la moitié des cytokines étudiées ont vu leur production augmenter de façon significative (IL-1 β , IL-6, IGF-1, Leptine mais pas TNF- α , IL-1 α , G-CSF, et VEGF). De façon similaire, l'étude de Tabet et al. (2011) a détecté une augmentation des ARNm (Acide Ribonucléique messagers) codant pour la protéine pro-inflammatoire CXCL2 mais pas de ceux codant pour le TNF- α (instillation intra-trachéale de MWCNT).

II.3. Granulomes inflammatoires

Lorsque le processus inflammatoire se poursuit, il peut y avoir formation de tissus granulaires puis de granulomes au niveau du tissu interstitiel conjonctif de la paroi pulmonaire, ou alvéolaire, ou spécifiquement au niveau de zones appartenant au tissu lymphoïde associé aux muqueuses au niveau de l'appareil respiratoire. Les granulomes inflammatoires sont composés majoritairement de macrophages alvéolaires activés (cytoplasme parsemé de vacuoles) et de quelques autres cellules inflammatoires comme les cellules géantes multi-nucléées, et de fibroblastes (voir **Figure 9**). Leur formation a été observée à de nombreuses reprises suite à une exposition aux CNT (Lam et al. 2004; Ma-Hock et al. 2009; Mercer et al. 2008; Muller et al. 2005; Osmond-McLeod et al. 2011; Pauluhn 2010; Porter et al. 2010; Shvedova 2005; Shvedova et al. 2008). Cependant, leur formation n'est pas systématique. Plusieurs études n'ont observé que des lésions granulaires (Mercer et al. 2011; Murray et al. 2012). Certaines études n'ont même observé aucun tissu inflammatoire de ce type (Ellinger-Ziegelbauer & Pauluhn 2009; Mangum et al. 2006; Mitchell et al. 2007; Tabet et al. 2011). Les granulomes sont généralement dus à une réaction focalisée et plusieurs études ont souligné leur association préférentielle avec des agglomérats de CNT (Mercer et al. 2008; Shvedova 2005; Lam et al. 2004). Toutefois l'étude de Poland et al. (2008) n'a observé de granulomes qu'avec des MWCNT de type longs et raides comparés à des MWCNT plus courts avec une tendance à former des agglomérats de CNT enchevêtrés.

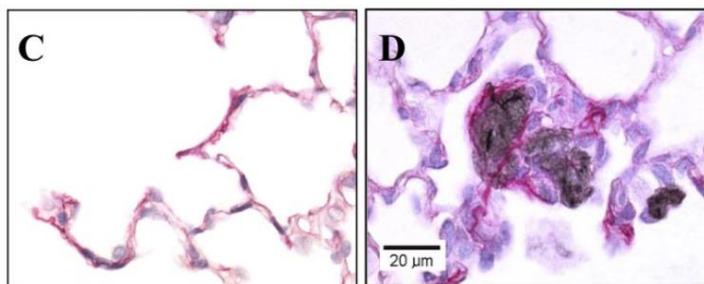


Figure 9 : Coupe pulmonaire colorée au rouge Sirius (C) d'une souris témoin non exposée, et (D) d'une souris exposée par aspiration pharyngale à 40 μ g de SWCNT : présence de granulomes multifocaux et d'amas de SWCNT (Shvedova 2005).

II.4. Structures fibreuses et fibrose

La présence de structures fibreuses pouvant aller jusqu'à une fibrose complète a été détectée comme un mécanisme de réponse pulmonaire à l'exposition aux CNT (Ma-Hock et al. 2009; Mercer et al. 2008; Muller et al. 2005; Porter et al. 2010; Shvedova 2005; Shvedova et al. 2008). Certaines études n'ont pas observé de structures fibreuses, mais ont toutefois noté une augmentation de la production de collagène (Mercer et al. 2011; Muller et al. 2005; Murray et al. 2012; Pauluhn 2010; Tabet et al. 2011). Ce phénomène peut, à terme, conduire au développement d'une fibrose interstitielle et donc à un épaississement de la paroi alvéolaire avec dysfonctionnement de la barrière alvéolo-capillaire indispensable à la fonction d'hématose. Contrairement aux granulomes, au sein desquels elles peuvent toutefois se former, ces structures fibreuses sembleraient préférentiellement se développer en réponse à la présence de CNT bien dispersés (Mercer et al. 2008; Shvedova 2005). Dans ce cas, cette conclusion est cohérente avec les résultats de l'étude de Poland et al. (2008) qui n'a détecté une fibrose que pour les MWCNT longs et raides moins enclins à la formation d'agrégats.

En conclusion, les granulomes semblent se former surtout autour de CNT agglomérés (typiquement des SWCNT ou des MWCNT enchevêtrés), tandis que les structures fibreuses et les fibroses se développeraieent plutôt au contact de CNT bien dispersés.

II.5. Biodistribution et biopersistance

De plus en plus, les études conduisent à une caractérisation de la réponse *in vivo* plus poussée sur le devenir des nanoparticules, dont les nanotubes, dans l'organisme.

Les impacts des CNT sur le poumon sont majoritairement réversibles selon un délai variable (Ellinger-Ziegelbauer & Pauluhn 2009; Mercer et al. 2008; Murray et al. 2012; Porter et al. 2010; Shvedova 2005; Shvedova et al. 2008; Tabet et al. 2011). Seule l'étude de Lam et al. (2004) n'observe toujours pas de disparition ou diminution des granulomes après 90 jours post-exposition. La biodistribution semble varier d'un type de CNT à l'autre (Lam et al. 2004). Après exposition par voie pulmonaire, ils sont préférentiellement pris en charge par les macrophages alvéolaires (Mangum et al. 2006; Mercer et al. 2011; Mitchell et al. 2007; Tabet et al. 2011) et peuvent être internalisés par phagocytose par ces cellules (Poland et al. 2008). Néanmoins, certains CNT semblent pouvoir diffuser dans l'espace interstitiel du poumon (Mercer et al. 2008; Muller et al. 2005; Porter et al. 2010), et peuvent atteindre par la suite les ganglions lymphatiques (Pauluhn 2010) (**Figure 10** et **Figure 11**). Ce mécanisme est sans doute dépendant de la taille et de la forme des CNT (Murphy et al. 2011; Donaldson et al. 2010).

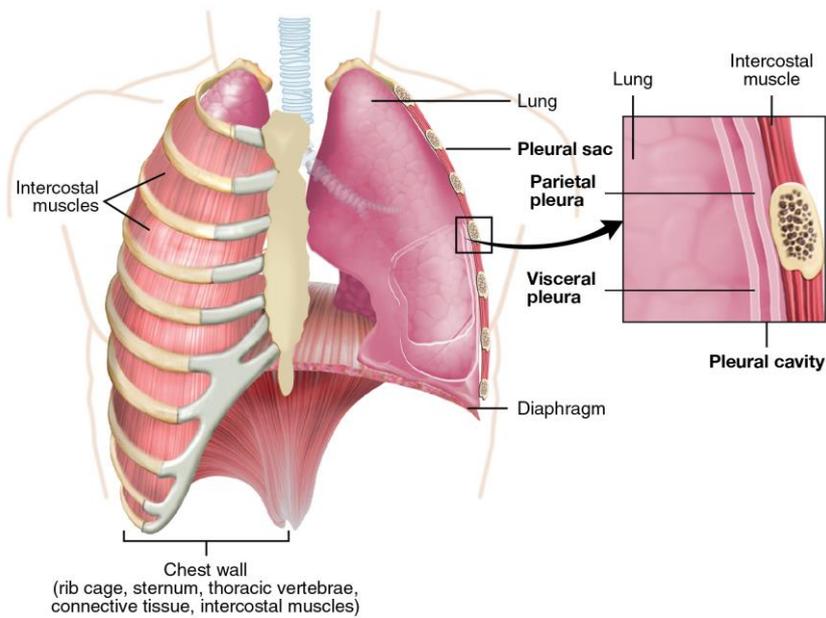


Figure 10 : Représentation schématique des poumons, avec un zoom sur la structure de la plèvre (OpenStax College 2013)

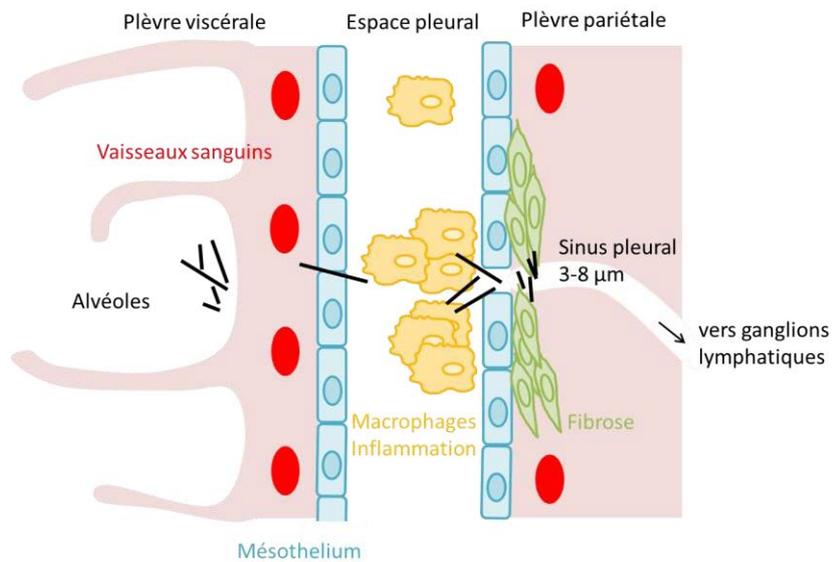


Figure 11 : Schéma représentant le passage des nanotubes de carbone dans l'espace pleural, ainsi que les mécanismes de défense mis en jeu (d'après Donaldson et al. 2010)

Le risque de diffusion généralisée dans le corps pourrait toutefois être limité. Ainsi, d'après l'étude de Deng et al. (2007), suite à une exposition intra-trachéale de souris, des MWCNT radioactifs ont uniquement été détectés dans les poumons (**Figure 12**). En outre, leur présence a diminué graduellement au cours du temps pour atteindre 20% de la dose d'exposition après 28 jours. De même, après exposition par voie intraveineuse, une très faible quantité de MWCNT a été détectée au niveau des poumons et a disparu après 28 jours. Ce délai d'un mois semble correspondre à celui nécessaire à la disparition des réponses inflammatoires générées (Mercer et al. 2008; Shvedova et al. 2008), et de la disparition des structures fibreuses (Shvedova 2005). Cependant, la biopersistance des CNT questionne et des contradictions subsistent. Une étude plus récente menée par le CEA (Czarny et al. 2014) a étudié des souris exposées par aspiration pharyngale à des CNT marqués au ^{14}C pendant 1 an. Ils ont mis en évidence une translocation des CNT des poumons vers la circulation sanguine, et une accumulation, certes faible, mais persistante des CNT dans des organes secondaires : principalement la rate et le foie (**Figure 13**). De plus nombreuses études *in vitro* questionnent la biodégradation des CNT et seront détaillées en partie dans le Chapitre 1, III.3.4.

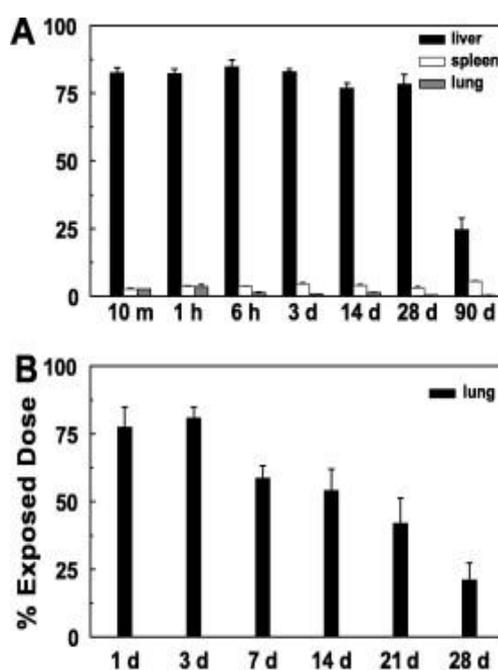


Figure 12 : Biodistribution et biopersistance de MWCNT marqués radioactivement (10-20 nm de diamètre, 10-600 nm de long) après exposition par voie intraveineuse (A), ou intra-trachéale chez des souris(B) (Deng et al. 2007).

Pour chaque expérience, la radioactivité a été mesurée dans le foie, la rate, les poumons, les matières fécales, l'estomac, les intestins, les reins, le cœur, le cerveau, les muscles, les os et la peau. Ne sont représentés que les organes où une quantité significative de radioactivité a été détectée.

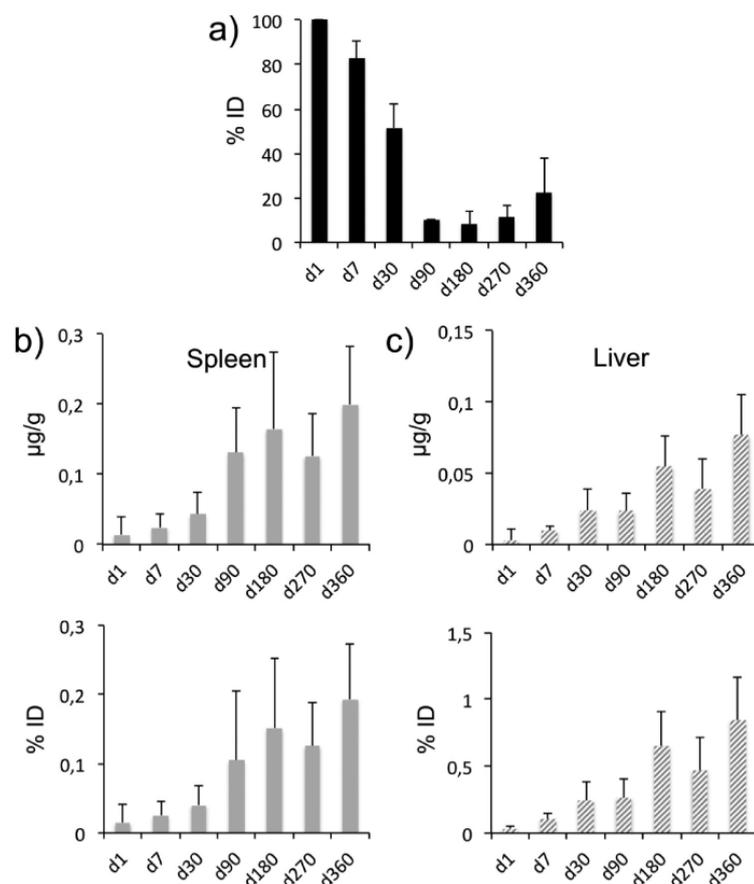


Figure 13 : Pourcentage de la dose administrée (%ID) de MWCNT marqués par du ^{14}C après exposition à 20 μg par souris par aspiration pharyngale présente dans a) les poumons, b) la rate et c) le foie. Les MWCNT ont un diamètre moyen de 40 nm, et une longueur moyenne de 3,9 μm (Czarny et al. 2014).

II.6. Stress oxydant et génotoxicité

Cette biopersistence possible des CNT interroge sur les conséquences à long terme d'une exposition chronique. L'exposition à de faibles doses de CNT biopersistants de manière répétée comme c'est le cas lors d'une exposition professionnelle renvoie encore à la catastrophe sanitaire de l'amiante et au risque très accru de développement de mésothéliomes pleuraux (cancers de la plèvre) que ces fibres peuvent déclencher. Une inflammation répétée, ainsi qu'un stress oxydant chronique sont des facteurs favorisant la destruction des tissus et l'initiation de cancers. Le stress oxydant ferait partie des mécanismes de réponse cellulaire lors des contacts cellules/CNT (Shvedova 2005; Shvedova et al. 2008), mais il ne semble pas automatique (Lam et al. 2004; Crouzier et al. 2010). Pour Tabet et al. (2011) la réponse oxydative est mise en jeu mais jusqu'à un certain point uniquement : augmentation de la quantité d'ARNm codant pour l'enzyme HO-1, un antioxydant, mais aucune augmentation des ARNm codant pour les

antioxydants GPX-1, et SOD-1. La génotoxicité *in vivo* des CNT est encore assez peu étudiée. L'étude de Kato et al. (2012) a démontré une augmentation significative d'endommagement de l'ADN liée au stress oxydant dans des poumons de souris exposées par voie intra-trachéale à des concentrations de 0,05 à 0,2 mg/animal de MWCNT (70-110 nm de diamètre, 1-4µm de long); ainsi qu'une augmentation des fréquences de mutations des gènes *gpt* et *Spi-* après expositions répétées à 0,2 mg/animal. L'étude de Yamashita et al. (2010) confirme cette capacité des CNT de taille variée à endommager l'ADN après exposition à 50 µg de CNT par voie intra-péritonéale (SWCNT de 5 à 15 µm de long, MWCNT <10 nm de diamètre, de 20 à 60 nm, de 60 à 100 nm et de longueur respective 1 à 2 µm, 5 à 15 µm, et 1 à 2 µm). L'étude de Kim et al. (2010), au contraire, infirme la capacité génotoxique de MWCNT de taille comparable après exposition à une dose identique. Ces contradictions proviennent sans doute encore une fois des disparités de procédures expérimentales (trois tests de génotoxicité différents : micronoyaux, comètes, test Ames) ou des différences des propriétés physico-chimiques des CNT. Le rapport du FIOH (2013) fait état d'une génotoxicité non systémique dont l'importance varie entre les types de MWCNT.

L'étude de Muller et al. (2009) a suivi des groupes de 50 rats pendant 2 ans après exposition intrapéritonéale à 2 ou 20 mg de MWCNT. Aucune augmentation du risque de mésothéliomes, ni d'autres tumeurs n'a été détecté. Cependant, plus récemment, l'institution gouvernementale australienne d'évaluation et de notification des produits chimiques industriels (NICNAS: « National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme ») a mené une étude de cancérogénicité de MWCNT sur des rongeurs après exposition par voie intra-péritonéale ou intrascrotale (Safe Work Australia 2012). Les MWCNT ont induit des mésothéliomes, dépendamment de leur longueur et de leur état d'agglomération. Cette étude rejoint celle de Takagi et al. (2012) où 4 groupes de 20 souris ont été suivies sur un an après injection intrapéritonéale de 0 ; 3 ; 30 ou 300 µg de MWCNT. Les résultats présentés en **Figure 14** montrent que les CNT induisent des mésothéliomes de façon dose-dépendante.

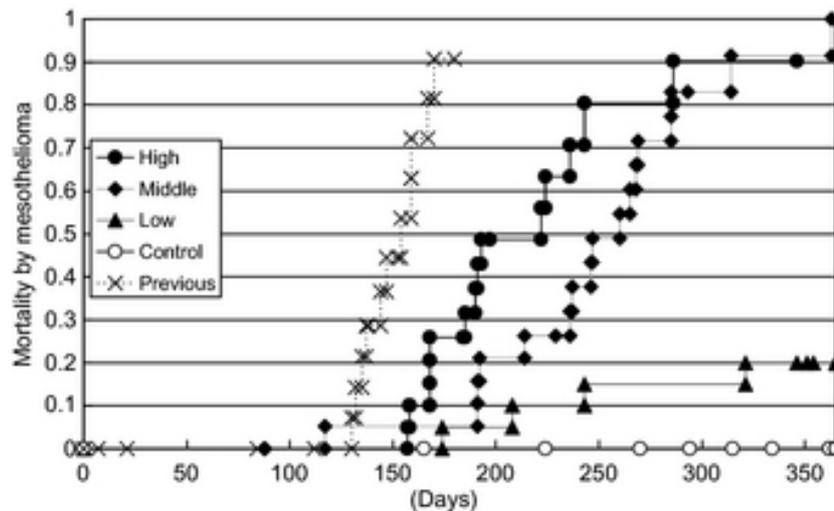


Figure 14 : Mortalité induite par mésothéliome après exposition intrapéritonéale à des MWCNT (70-100 nm, 1-20 μm , Fe 0,35%, S 0,05%) (Takagi et al. 2012)

L'étude du NICNAS a conduit l'agence nationale australienne de santé et sécurité au travail (Safe Work Australia) à classer les nanotubes de carbone comme :

- Cancérogène de classe 2, code de danger H350 : « Peut provoquer le cancer. », selon le règlement GHS (« Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals » système général harmonisé de classification chimique),
- Cancérogène de catégorie 3, nocif (Xn), phrase de risque 40 « Effet cancérogène suspecté: preuves insuffisantes. », selon les critères australiens approuvés pour la classification des substances dangereuses (« Approved criteria for classifying hazardous substances », recommandations australiennes basées sur le système harmonisé de classification des substances dangereuses).

Ce rapport considère aussi deux études à plus long terme chez des rongeurs (90 jours après inhalation) qui confirment la formation de granulomes et de fibroses comme de nombreuses autres études *in vivo*, ce qui a amené l'agence à classer également les CNT comme toxiques ou nocifs :

- Toxicité systémique pour certains organes cibles de catégorie 2, code de danger H373 : « Risque présumé d'effets graves pour le poumon/système respiratoire à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée », selon le règlement GHS.
- Nocif, phrase de risque R48/20 : « Nocif : risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par inhalation. », selon les critères australiens approuvés pour la classification des substances dangereuses.

BILAN ETAT DE L'ART :

Toxicité pulmonaire *in vivo* chez l'animal

Il est impossible de considérer une toxicité unique liée aux nanotubes de carbone. Leur potentiel toxique est fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, notamment leur taille, forme, longueur, chimie de surface et état d'agglomération. Les CNT peuvent déclencher un processus inflammatoire associé à la formation de granulomes et de lésions fibreuses voire de fibroses. Ces réponses biologiques sont un terrain privilégié pour le développement de mésothéliomes pleuraux. Le stress oxydant est encore assez peu étudié alors qu'il semble s'agir d'une réponse cellulaire majeure. Il est plus facile de l'observer *in vitro* du fait de la rapidité de la réponse et la durée de vie courte des marqueurs de stress.

En conclusion, il n'est pas possible au jour d'aujourd'hui de prédire l'effet d'un type de CNT particulier. De ce fait, l'apport des études *in vitro* est crucial pour comprendre l'influence des propriétés physico-chimiques des CNT sur les mécanismes cellulaires mis en jeu.

III. Toxicité pulmonaire *in vitro*

III.1. Modèles et réponses cellulaire

III.1.2. Macrophages alvéolaires

Afin d'apporter une meilleure approche mécanistique tout en réduisant les coûts, les problématiques éthiques, et en améliorant la faisabilité technique, les études *in vitro* complètent de manière avantageuse les études *in vivo*. Le choix des cellules étudiées en toxicologie pulmonaire est crucial car les réponses cellulaires peuvent varier en fonction du modèle choisi (Sohaebuddin et al. 2010; Schrurs & Lison 2012). Nous nous intéresserons tout particulièrement aux macrophages, du fait de leur capacité de phagocytose en tant que première ligne de défense immunitaire. Il s'agit d'un des trois types cellulaires présents au niveau des alvéoles pulmonaires, structures les plus profondes des voies respiratoires.

L'appareil respiratoire des mammifères est constitué d'une série d'organes pouvant se répartir en deux groupes (**Figure 15**) :

1. voies aériennes supérieures (voies respiratoires extra-thoraciques, en bleu clair sur la figure) : cavité nasale, pharynx, larynx et trachée,
2. voies aériennes inférieures (voies respiratoires intra-thoraciques) : bronches, bronchioles débouchant dans les alvéoles pulmonaires.

Les alvéoles pulmonaires sont le centre des échanges gazeux. Leurs parois ultrafines (de l'ordre de 0,2 μm) et leur forte vascularisation permettent l'hématose, c'est-à-dire l'ensemble des échanges gazeux permettant la transformation du sang pauvre en dioxygène et riche en dioxyde de carbone en sang réoxygéné. Chez l'homme adulte, la surface d'échange des 300 millions d'alvéoles représente de 100 m^2 à 150 m^2 avec un total de 15 à 20 m^3 d'air inspiré en 24h (Lombard 2009). Les alvéoles sont structurées autour de la lumière alvéolaire bordée d'un épithélium et d'un interstitium (**Figure 16**). L'interstitium ou cloison inter-alvéolaire accueille de nombreux capillaires sanguins et quelques fibroblastes. L'épithélium, reposant sur une lame basale est constitué de deux types cellulaires :

1. les pneumocytes de type I : impliqués dans les échanges gazeux,
2. les pneumocytes de type II : sécrétant le surfactant alvéolaire (permettant notamment de résister à la pression des gaz).

Un troisième type cellulaire spécifique vient s'ajouter à cette structure : les macrophages alvéolaires libres à la surface de l'épithélium.

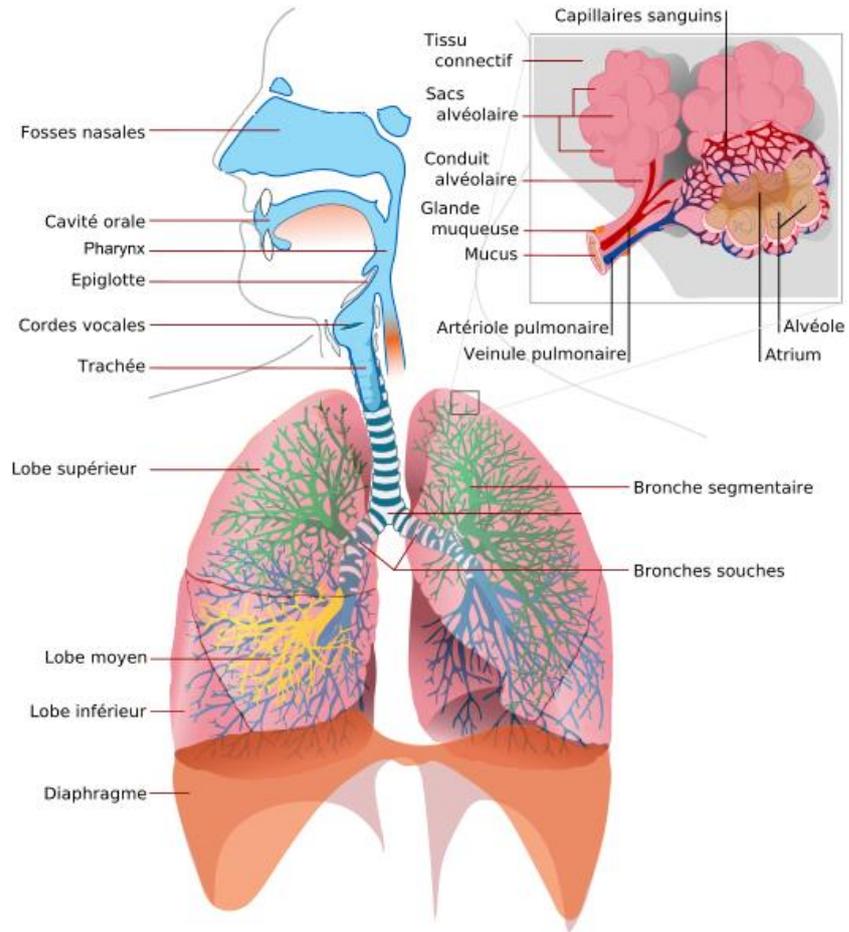


Figure 15 : Schéma de l'appareil respiratoire humain (adapté de Mariana Ruiz Villarreal)

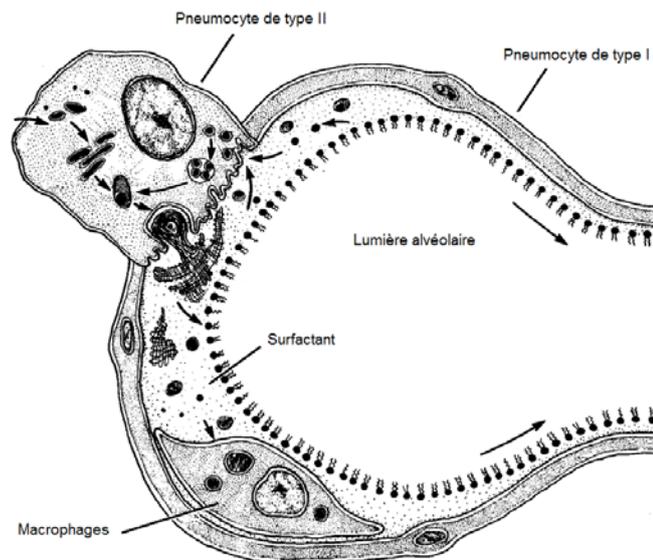


Figure 16 : Schéma structurel d'une alvéole pulmonaire (adapté de Hawgood & Clements 1990)

Les macrophages pulmonaires sont la première défense du système immunitaire et la principale voie d'élimination des particules qui auront réussi à passer le long des voies respiratoires sans être neutralisées par l'appareil muco-ciliaire caractéristique du tractus respiratoire (en amont du poumon profond représenté par les alvéoles pulmonaires) (Kayat et al. 2011). Les macrophages proviennent de la différenciation de monocytes sanguins produits dans la moelle osseuse après infiltration dans un tissu. Selon leur localisation anatomique, leur morphologie peut légèrement varier. Les macrophages se présentent sous la forme de cellules ovalaires d'environ 20-25 μm de diamètre, avec des prolongements cytoplasmiques sous forme de pseudopodes ou de voiles ondulants. Leur rôle principal est de phagocyter les particules ou éléments biologiques exogènes et les déchets biologiques endogènes présents dans les alvéoles pulmonaires. La phagocytose est un mécanisme d'internalisation par déformation du cytoplasme en pseudopodes encerclant l'élément à phagocyter (**Figure 17**). Il est alors bloqué dans une vacuole constituée de milieu externe, aussi appelée phagosome, et entraîné à l'intérieur du cytoplasme du macrophage. La cellule déclenche une cascade de mécanismes de dégradation par voies enzymatiques ou par une profusion d'espèces réactives de l'oxygène. Si toutefois l'élément ingéré ne peut être détruit, le macrophage le conserve au sein du cytoplasme. Il continuera son activité de phagocytose jusqu'à atteindre une concentration critique entraînant la destruction de la cellule. D'autres macrophages viendront alors phagocyter les déchets et les éléments biopersistants. Dans le cas d'expositions chroniques, ce cycle de biopersistance donne lieu à une accumulation de particules dans les tissus. Cela peut entraîner des lésions irréversibles et mener à des pathologies comme le cancer ou l'asbestose avec l'amiante.

Les lignées commerciales de macrophages immortalisés sont fréquemment utilisées pour les tests de nanotoxicité *in vitro*. Elles permettent de reproduire en laboratoire les interactions privilégiées des CNT avec les macrophages alvéolaires. Certaines études toutefois, leur préfèrent les pneumocytes ou encore des cellules primaires issues de prélèvements *ex vivo* par une technique de lavage broncho-alvéolaire. Cependant, il est difficile d'obtenir une culture stable de cellules primaires et la reproductibilité est souvent plus faible qu'avec une lignée immortalisée. C'est pourquoi pour cette thèse le choix du type cellulaire s'est porté sur une lignée bien documentée de macrophages murins immortalisés (RAW 264.7).

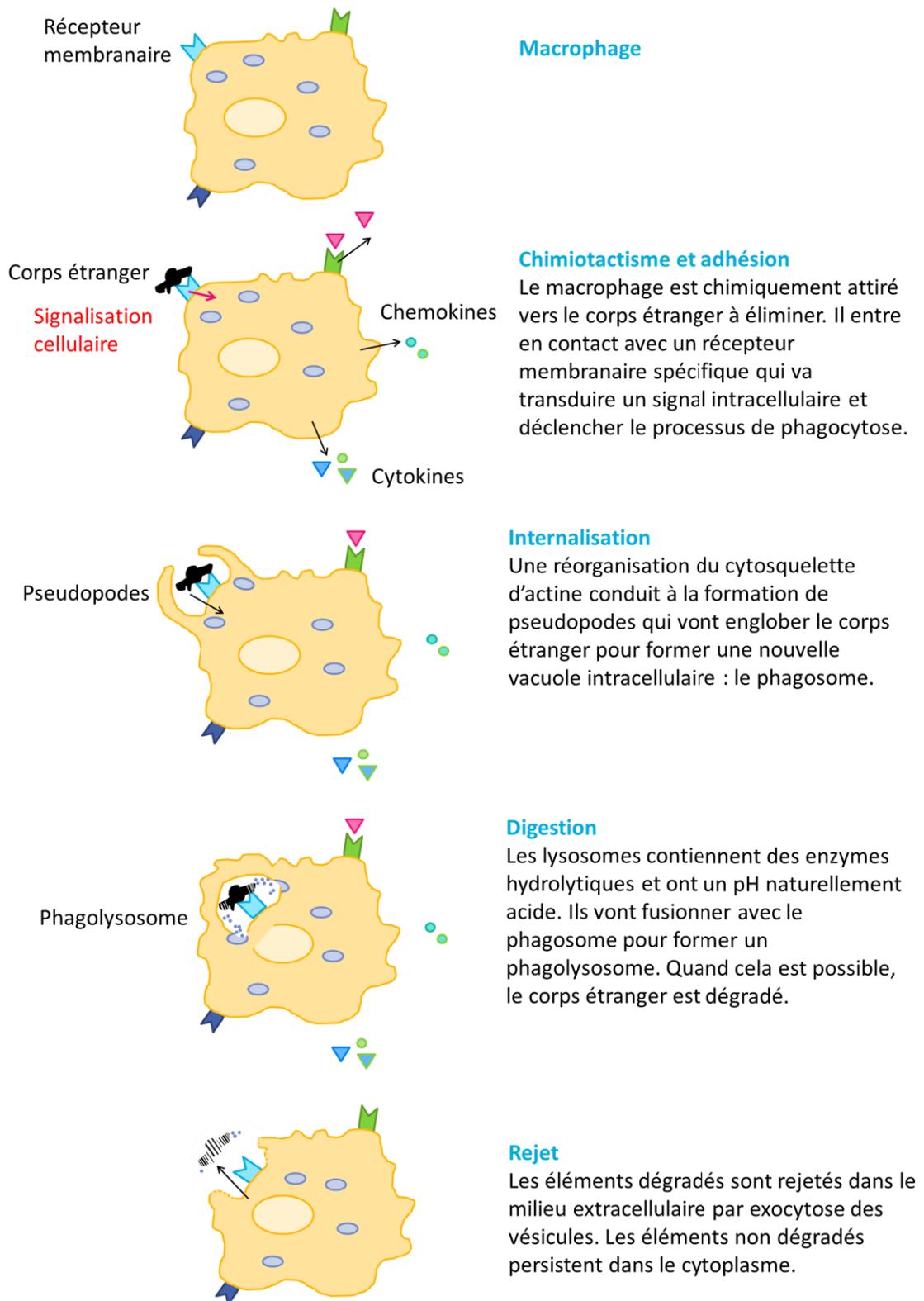


Figure 17 : Schéma des différentes étapes de la phagocytose (adapté de Boumahdi 2009)

III.1.2. Principales réponses cellulaires

Cytotoxicité

La cytotoxicité d'un élément se définit par sa capacité à altérer le fonctionnement cellulaire jusqu'à la mort de la cellule. Elle est souvent détectée par mesure de l'activité métabolique. Les tests MTT, XTT, et MTS par exemple dosent l'activité mitochondriale, reflet de l'état de la respiration cellulaire. Nous verrons toutefois que ces tests peuvent être biaisés par les CNT. Une autre technique très utilisée dans les études *in vitro* comme *in vivo* est la détection de la lactate déshydrogénase (LDH) extracellulaire. Cette enzyme est présente en quantité importante au sein du cytoplasme, et les membranes endommagées laissent échapper la LDH dans le milieu extracellulaire où elle peut être dosée à l'aide de tests colorimétriques. Si une forte cytotoxicité est induite, il est aussi possible de déterminer le mécanisme préférentiel de mort cellulaire induit. L'apoptose, mécanisme de mort cellulaire programmée est en effet à différencier de la nécrose, destruction cellulaire due à un traumatisme (**Figure 18**). Dans le cas de l'apoptose uniquement, les corps apoptotiques, c'est-à-dire les débris cellulaires, restent entourés d'une membrane cellulaire empêchant l'inflammation et permettant aux macrophages de les phagocyter. Une nécrose au contraire entraîne généralement une réponse inflammatoire locale.

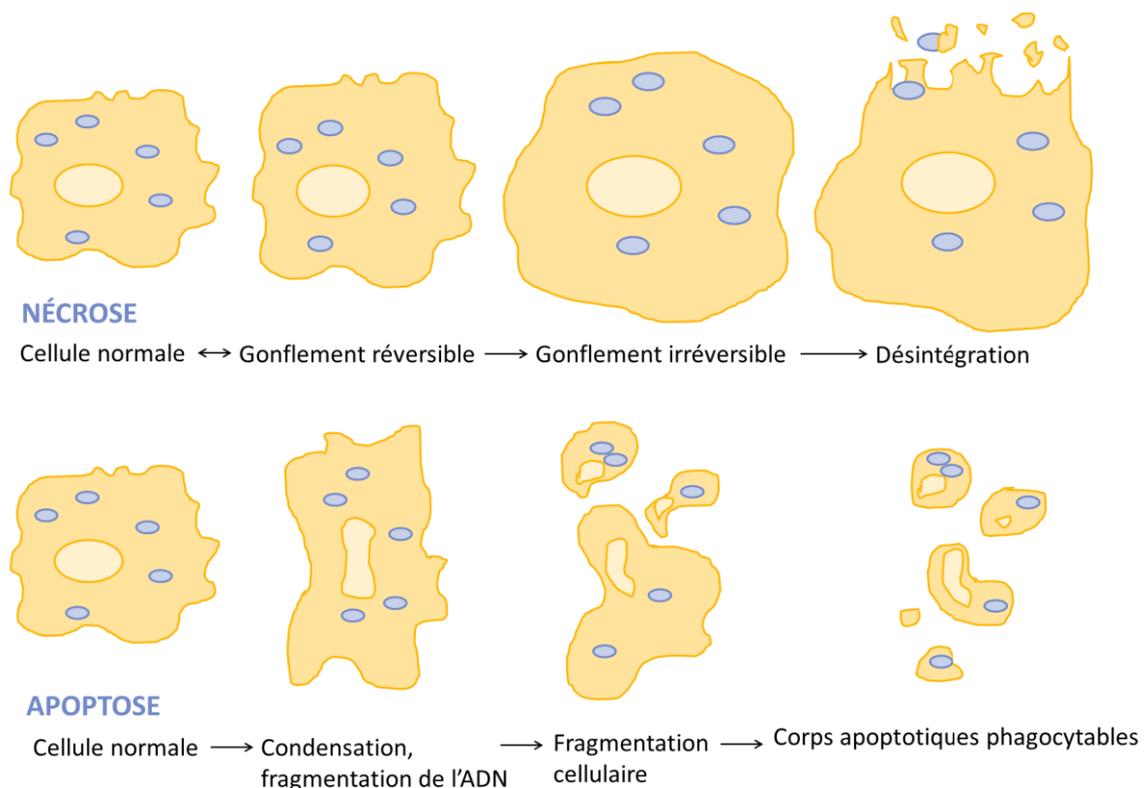


Figure 18 : Représentation schématique de l'apoptose : mort cellulaire physiologique, qui peut toutefois avoir lieu dans un contexte pathologique, et de la nécrose : mort cellulaire pathologique (adapté de Roche Diagnostics 2008)

Réponse pro-inflammatoire

L'inflammation est un mécanisme de défense permettant de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer un élément pathogène et de réparer les éventuelles lésions tissulaires. La cascade de signalisation la précédant est appelée réponse pro-inflammatoire. Au cours de celle-ci, des médiateurs (cytokines) sont produits par les cellules effectrices du système immunitaire principalement, pour mobiliser les cellules inflammatoires sur le site de la stimulation. Le TNF- α (Tumour Necrosis Factor α) est la cytokine la plus courante, elle stimule la phase de réaction aiguë et est associée à un état d'activation macrophagique. D'autres cytokines comme les interleukines IL-1 β et IL-6 (Interleukine 1 β ou 6) produites par les macrophages, les chimiokines, et les interférons peuvent aussi être dosés afin de déterminer l'activation de la réponse pro-inflammatoire.

Stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre les sources pro-oxydantes et les systèmes antioxydants (voir **Figure 19**). De source exogène ou endogène, il peut notamment être une réponse secondaire à l'inflammation. Il peut mener à des lésions intracellulaires : dégradations moléculaires et protéiques, peroxydation lipidique, endommagement de l'ADN ; et des dysfonctionnements cellulaires : excès de la prolifération, apoptose, dépôts lipidiques anormaux, mutagenicité. De façon chronique, il peut favoriser l'apparition de fibroses et emphysèmes pulmonaires, cancers, troubles cardio-vasculaires ou neurodégénératifs (Favier 2003). Les espèces oxydantes de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species ») sont les principales sources pro-oxydantes. Les ROS au sens large regroupent :

1. les radicaux libres primaires : anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle OH^{\bullet} , monoxyde d'azote NO^{\bullet} ,
2. et les espèces non-radicalaires : peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxynitrite $ONOO^-$, oxygène singulet 1O_2 , etc.

Les espèces réactives de l'azote (RNS pour « reactive nitrogen species ») peuvent, selon les classifications, être séparées de cette catégorie.

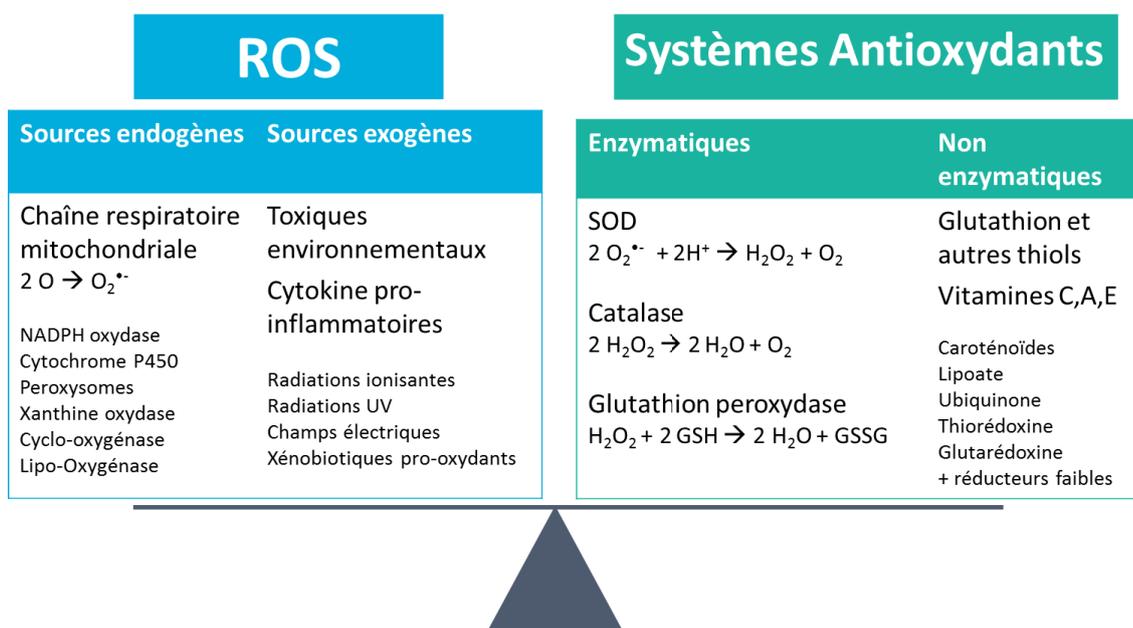


Figure 19 : Schéma de la balance du stress oxydant entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les systèmes antioxydants (d'après Delattre et al. 2005)

Notons que le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre, mais un élément très réactif produisant des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton, étape du cycle de Haber-Weiss (Équation 2). Ce cycle de réactions est catalysé par un cation métallique (généralement Fe^{2+} ou Cu^{2+}). D'autres métaux peuvent accroître le stress oxydant sans être directement impliqués dans des réactions d'oxydo-réduction. L'aluminium est ainsi capable de stabiliser les ions ferreux, favorisant de ce fait le cycle de Haber-Weiss (Ruipérez et al. 2012). La présence d'impuretés métalliques au sein des CNT a ainsi été identifiée comme source possible de stress oxydant (voir Chapitre 1, III.3.2.).



Les ROS ne sont dommageables que lorsque leur concentration est déséquilibrée par rapport aux systèmes antioxydants. Ainsi, le peroxydite est impliquée lors de la phagocytose dans le mécanisme d'explosion oxydative (« oxidative burst »). OH^{\bullet} et ROO^{\bullet} sont aussi utilisés par les macrophages pour la destruction de bactéries, et la régulation de l'apoptose. Les deux principaux systèmes antioxydants régulant le niveau des ROS sont le glutathion (GSH) et les

superoxydes dismutases (SOD). Le GSH piège les radicaux libres afin de former des molécules plus importantes et faciliter leur élimination. La SOD est une protéine au cœur hydrophobe dans lequel les anions superoxydes viennent se loger et se faire dégrader par une réaction de dismutation catalysée par un cofacteur métallique. La catalase est une enzyme les plus efficaces connues, elle peut catalyser grâce à quatre atomes de fer la décomposition de millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène par seconde.

La détection d'un stress oxydant se fait donc soit par la détection d'un taux de ROS anormalement élevé, soit par la détection d'une activité antioxydante déséquilibrée.

L'évaluation de la toxicité *in vitro* d'un élément peut donc se faire par l'étude de ces trois principales réponses cellulaires, mais aussi de la génotoxicité, mutagénicité, et des endommagements de l'ADN induits. Les tests classiques utilisés en toxicologie peuvent toutefois être difficiles à interpréter dans le cas d'une étude sur les CNT.

III .2. Limitations des études

Une des grandes limitations des études de toxicité *in vitro* des nanomatériaux est l'absence de standardisation sur le choix des tests, des concentrations, de la dispersion des nanomatériaux ou encore du temps de contact entre les cellules et ces nanomatériaux (Schweinberger & Meyer-Plath 2011; Krug & Wick 2011). Les comparaisons entre les études sont, de ce fait, moins pertinentes. En outre, l'utilisation de nanomatériaux pose des questions sur les métriques adaptées (surface, nombre, ou masse) et les caractérisations nécessaires. A cela viennent s'ajouter des problématiques spécifiques aux CNT. Ainsi leur morphologie avec un ratio longueur/largeur extrêmement important gêne par exemple la mesure de leur taille (par microscopie électronique où il est difficile de déterminer leur longueur, ou par diffusion dynamique de la lumière où l'approximation d'une particule sphérique ne peut pas être utilisée). Leur hydrophobicité rend de plus très difficile la suspension des CNT en milieu aqueux.

III.2.1. Dose

La concentration massique est la métrique utilisée de façon réglementaire pour les études de toxicité de particules. La masse est en effet facilement mesurée et souvent directement reliée aux effets biologiques par des relations linéaires de dose-dépendance. Seules les fibres font exception à cette règle avec des doses réglementaires en nombre (Lacour et al. 2012).

A une échelle nanométrique cependant, l'importance relative des propriétés physico-chimiques est modifiée. Comme nous l'avons vu en première partie de ce chapitre (voir I.1.), à masse égale la surface d'une nanoparticule est nettement supérieure à celle d'une particule micrométrique. L'influence sur la réponse biologique de sa surface pourrait donc être bien supérieure à celle de sa masse. En France, le programme NanoNorma (www.nanonorma.org), et l'INRS (Witschberg & Fabriès 2005) soulignent la nécessité d'identifier la métrique la plus adaptée pour les études de toxicité des nanomatériaux : masse, nombre, ou surface spécifique. La technique de mesure de la surface spécifique basée sur la méthode Brunauer Emmett Teller (B.E.T.) est néanmoins peu précise. Cette technique est basée sur une adsorption homogène du gaz à la surface de l'élément. Or, Lehman et al. (2011) soulignent que les phénomènes d'agrégation, de faisceaux, des défauts de structures notamment l'ouverture ou non des tubes pourraient fortement influencer cette mesure. Il serait de plus très malaisé de mesurer en routine et en temps réel l'exposition en surface spécifique sur un site industriel (Donaldson & Poland 2013). Petersen & Henry (2012) soulignent aussi l'évolution de l'état de surface des CNT au cours des études (dispersion, agglomération, ruptures, ouverture des tubes, etc.) augmentant l'imprécision sur cette métrique. Le nombre de particules semblerait donc être la métrique la plus appropriée. Néanmoins, pour les CNT il est extrêmement difficile d'obtenir cette valeur. Mesurer la masse exacte d'un seul CNT, demanderait d'individualiser des éléments nanométriques afin de pouvoir convertir une dose massique en nombre. La difficulté d'obtenir

une dose en nombre rend par ailleurs très difficile l'application de la définition du décret français suite à la déclaration de l'UE sur les nanomatériaux (50% en nombre <100 nm) (2011/696/UE). Réaliser des études avec des doses en masse et comparer les résultats avec les équivalents en surface semblent donc être le meilleur compromis actuel pour l'étude des CNT.

III.2.2. Interférences avec les tests biologiques

Les techniques classiques utilisées pour les tests *in vitro* de toxicité ont été largement reprises pour étudier les nanomatériaux. Cependant, la présence de CNT peut biaiser plusieurs de ces tests. Wörle-Knirsch et al. (2006) ont montré que les CNT pouvaient entraîner des faux-positifs avec le test de cytotoxicité le plus utilisé : le test MTT. Les CNT interagissent en effet avec les sels de tétrazolium utilisés pour ce test (mais pas avec ceux utilisés pour les tests WST-1, INT, XTT). En 2007, l'étude de Belyanskaya et al. (2007) a confirmé cette interférence et l'étude de Casey et al. (2007) a conclu par spectroscopie à une interférence des CNT avec des tests classiques de cytotoxicité : MTT mais aussi rouge neutre, WST-1, bleu de Coomassie, et bleu d'Alamar. Monteiro-Riviere et al. (2009) ont réalisé une évaluation des interférences de nanomatériaux de carbone avec 6 tests de cytotoxicité colorimétriques ou fluorimétriques. Pour les SWCNT des interférences biaisaient également les résultats des tests au rouge neutre, MTT, bleu d'Alamar, et LDH par CytotoxOne™, seuls deux tests (CellTiter 96® Aqueous One et CellTiter-Blue®) fonctionnaient de manière satisfaisante. De la même manière, des interférences ont été mises en évidence entre les CNT et des tests classiques de génotoxicité : test des micronoyaux et test des comètes (Hirsch et al. 2011). Les sources de ces interférences restent toutefois encore mal comprises : action chimique, adsorption, ou influence sur la lecture colorimétrique.

Deux stratégies sont généralement déployées pour prendre en compte ces interférences : la multiplication des tests ou la correction des biais. Multiplier les tests est coûteux et donne une indication pauvre des résultats réels si l'on sait ces tests biaisés. Plusieurs essais de correction des biais se sont dernièrement développés (Ali-Boucetta, Khuloud T Al-Jamal, et al. 2011; Fröhlich et al. 2012; Fertsch-Gapp et al. 2011). Cependant, la gestion des biais est encore assez rare dans les études de toxicité des nanotubes de carbone, d'une part parce que les corrections ne sont pas toujours facilement réalisables, d'autre part parce que la présence de ces biais est encore controversée notamment pour leur spécificité en fonction du type de CNT étudiés.

III.2.3. Dispersion

L'hydrophobicité des CNT rend difficile leur dispersion dans des milieux aqueux et les CNT isolés sont rares en suspension. Les CNT, surtout ceux de faible diamètre, ont tendance à former des structures de type « faisceau » (« bundles » en anglais) : les tubes se lient dans le sens de la longueur diminuant ainsi la surface accessible (**Figure 20**). Les CNT sont de plus très

souvent présents sous la forme d'agrégats (liés par des liaisons chimiques fortes) non structurés ou d'agglomérats (liés par des liaisons faibles) avec une surface d'interaction plus faible. Les milieux biologiques utilisés pour les tests de toxicité *in vitro* étant principalement aqueux, il est difficile d'obtenir une dispersion stable des CNT. Pour limiter les agglomérats et dans une moindre mesure les agrégats, deux axes d'approche sont privilégiés :

3. L'utilisation d'un tensio-actif permet de facilement disperser et stabiliser les CNT. L'utilisation de ceux-ci est toutefois controversée. En effet, le surfactant va enrober les CNT changeant ainsi leur chimie de surface et leur « corona » c'est-à-dire la couche de protéines potentiellement adsorbées à leur surface (Nel et al. 2009; Lynch & Dawson 2008). L'étude de Chen et al. (2011) a démontré de fait que le choix du tensio-actif modifiait fortement la réponse cellulaire.
4. L'application d'ultrasons va permettre de casser les liaisons faibles et donc de diminuer la quantité d'agglomérats de la suspension. Les CNT ne subissent aucune modification chimique, toutefois à forte puissance, les ultrasons peuvent créer des défauts de structure voire rompre les tubes (Lu et al. 1996). Le temps de traitement et la puissance appliquée doivent donc être optimisés.

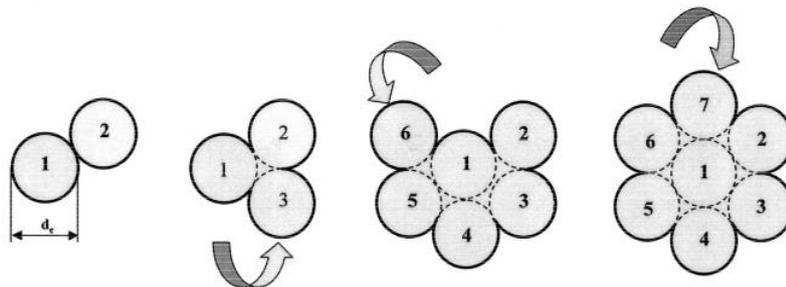


Figure 20 : Représentation schématique de la formation de faisceaux par addition successive de nanotubes de carbone (Peigney et al. 2001).

Certaines études *in vitro* évitent l'addition de sérum (sérum de veau fœtal, FBS pour « foetal bovine serum ») dans leur milieu de culture afin d'éviter son action tensio-active avec une modification de la chimie de surface des CNT. Cependant, les cultures cellulaires même sur des cellules immortalisées restent sensibles, et la non-utilisation de sérum peut les fragiliser et pourrait exacerber les réponses biologiques ou entraîner une perte rapide de viabilité cellulaire. Le travail de Zhang et al. (2011) n'a toutefois identifié que de très faibles différences entre les tests réalisés avec et sans sérum.

Les études d'exposition environnementale pour l'instant peu nombreuses n'ont pu donner assez d'indication sur l'état de dispersion des CNT sous la forme d'aérosols, mais la présence de faisceaux, d'agglomérats et d'agrégats est très probable. Une fois inhalés, les CNT sous soumis à un environnement aqueux mais riche en tensioactifs naturels. Il n'apparaît pas nécessaire de

chercher à obtenir des CNT isolés uniquement, mais un compromis dans leur dispersion est à trouver pour se rapprocher du réel et comprendre au mieux les mécanismes de toxicité via les études *in vitro*.

III.2.4. Nécessité d'une caractérisation physico-chimique rigoureuse des nanotubes de carbone

Les premières études sur les CNT ont conclu qu'il n'y a pas une réponse biologique unique fonction de la substance mais que celle-ci varie en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Il est donc fondamental de les caractériser de façon rigoureuse. L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE ou OECD en anglais) a publié en 2012 un rapport pour l'étude de nanomatériaux manufacturés (OECD 2012). Dans ce rapport, il est fait état de 19 points à caractériser pour l'identification des propriétés physico-chimiques d'un nanomatériau :

1. Taille, forme
2. Distribution de taille
3. Agrégation et agglomération
4. Chimie : composition et identification
5. Surface spécifique
6. Chimie de surface
7. Charge de surface, potentiel zêta et constante d'Hamaker
8. Dispersion dans l'eau et influence sur les propriétés du nanomatériau
9. Dispersions liquides
10. Structure cristalline
11. Tensions de surface
12. Taux d'empoussiérement (« dustiness »)
13. Taille cristalline
14. Images par microscopie électronique
15. Activité photocatalytique
16. Densité apparente
17. Porosité
18. Coefficient de partage octanol/eau
19. Formation de radicaux libres

Cependant, une telle caractérisation est très coûteuse et chronophage. L'Organisation internationale de normalisation (ISO pour « International Organization for Standardization ») recommande une identification des propriétés les plus pertinentes pour la caractérisation d'un nanomatériau (ISO - International Organization for Standardization 2012a) :

1. Taille et distribution granulométrique
2. Etat d'agglomération/agrégation dans le milieu considéré
3. Forme : longueur, largeur et rapport de la dimension la plus longue sur la plus courte pour les fibres et particules allongées
4. Surface spécifique
5. Composition chimique
6. Pureté
7. Composition chimique de surface
8. Charge de surface et solubilité
9. Dispersibilité.

Il est à noter que cette liste simplifiée prend en compte le taux d'impureté qui est une caractéristique cruciale pour les CNT. Les impuretés métalliques provenant des catalyseurs utilisés lors de la production auraient des effets importants sur la toxicité des CNT notamment sur la génération d'un stress oxydant (Ge et al. 2012; Kagan et al. 2006; Pulskamp et al. 2007). Un autre point non mentionné est le taux de défauts de structure qui semble lui aussi déterminant pour l'évaluation de la réponse biologique (Fenoglio et al. 2008; Muller et al. 2008).

L'ISO conseille de réaliser cette caractérisation avec le matériau « tel que reçu », « tel qu'administré » et « après administration ». Cependant, une telle recommandation apporte de la lourdeur dans les études et n'est pas forcément réalisable. Il est techniquement difficile de récupérer le matériau en quantité suffisante après administration. Le nombre d'études de toxicité caractérisant les nanomatériaux évalués augmentent de façon importante, mais se contentent généralement d'une caractérisation avant administration. La nécessité d'une caractérisation physico-chimique en amont des études de toxicité implique des compétences pluridisciplinaires afin d'identifier l'influence des caractéristiques des CNT sur les réponses biologiques.

III.3. Caractéristiques physico-chimiques des nanotubes de carbone et réponse biologique

III.3.1. Taille

La taille des CNT a été une des premières caractéristiques physico-chimiques à être mise en question au regard de leur toxicité. Le domaine nanométrique a été défini en fonction des différences de propriétés et d'activité biologique de matériaux aux dimensions très petites.

Une première hypothèse, suggère une augmentation de la toxicité associée à une diminution de taille des CNT. Fenoglio et al. (2012) ont comparé un type de MWCNT de faible diamètre ($9,4 \pm 0,3$ nm) avec un type de MWCNT de diamètre important (70 ± 2 nm). Les MWCNT les plus fins ont été identifiés comme produisant une réponse cytotoxique et un stress oxydant plus important (dosage de la LDH sur macrophages murins, et des ROS *in vivo* après injection-intrapéritonéale chez le rat). Sur trois lots différents de MWCNT, Nagai et al. (2011) ont également observé une cytotoxicité plus élevée pour les plus fins. Cependant, il est difficile de réaliser des études mono-factorielles, et les lots de Fenoglio et al. et Nagai et al. n'avaient pas des caractéristiques physico-chimiques semblables. Nagai et al. ont toutefois tracé les courbes de corrélation pour les autres paramètres physico-chimiques et n'ont constaté aucune autre connexion directe avec la réponse biologique. Concernant l'influence de la longueur, Bussy et al. (2012) ont observé une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation avec les MWCNT les plus courts, mais sans changement de cytotoxicité avec des MWCNT provenant de la même production mais avec des temps de chauffage différents ou un post-traitement par ultrasons.

Ces résultats ont été contredits à plusieurs reprises par des études proposant au contraire une inflammation amplifiée par des CNT longs et rigides. Brown et al. (2007) comparent 3 types de MWCNT de diamètre et morphologie différents : 1) MWCNT rigides, 20-100 nm de diamètre (environ 50 μ m de longueur), 2) MWCNT rigides, 150 nm de diamètre (présence de nanofibres de carbone, quelques micromètres de longueur) et 3) MWCNT agglomérés et souples, 20 nm de diamètre (quelques micromètres de longueur). Les MWCNT rigides 1) et 2) ont provoqué une réponse pro-inflammatoire et un stress oxydant plus important mais pas de cytotoxicité sur des cellules primaires humaines mononucléées et sur une lignée de monocytes humains THP-1. Hamilton et al. (2013) et Yamashita et al. (2010) ont également conclu à une augmentation de la réponse biologique avec les CNT les plus longs et les plus épais : augmentation de l'inflammation *in vivo* ou *in vitro*, augmentation de la génotoxicité (pour Yamashita et al, lignée de cellules épithéliales humaines A549, et THP-1), mais pas de la cytotoxicité. L'étude *in vitro* conduite par le FIOH (2013) vient confirmer ces résultats *in vivo* : les réponses biologiques les plus fortes ont été détectées pour le type de MWCNT longs et

rigides (« needle-like » >50 nm, $16\ \mu\text{m}$) et non pour les MWCNT fins et courts ou longs mais enchevêtrés (avec des longueurs de 40 à $50\ \mu\text{m}$). L'étude de Schinwald et al. (2012) a été mise en place pour tenter de déterminer la longueur seuil à partir de laquelle les fibres produisent une inflammation de la plèvre chez la souris (après une injection intra-pleurale). Elle a été conduite de façon plus complète sur des nanofibres d'argent pour lesquelles le seuil a été fixé à $5\ \mu\text{m}$. Pour les MWCNT une inflammation a été observée pour les tubes de 85 nm de diamètre et $13\ \mu\text{m}$ de longueur ainsi que pour les tubes de 165 nm de diamètre et $36\ \mu\text{m}$ de longueur, mais pas pour ceux de 20 - 30 nm de diamètre et $2\ \mu\text{m}$ de longueur. Les CNT pourraient donc suivre un modèle de pathogénicité spécifique aux fibres, à relier au concept de « phagocytose frustrée ». D'après Donaldson & Poland (2013) ce concept a été défini pour la première fois par Kuschner & Wright en 1976 au sujet de fibres de verre et d'amiante. Dans ce cas de figure, les macrophages n'arrivent pas à phagocyter entièrement les fibres de longueur trop importante malgré une signalisation du corps exogène. Ce phénomène peut déclencher des mécanismes d'inflammation, de stress oxydant, de génotoxicité ou d'apoptose (Gustavsson et al. 2012; Tran et al. 2011; Brown et al. 2007). Schinwald et al. (2012) a étudié l'effet de différents types de nanofibres et a proposé une longueur limite de $4\ \mu\text{m}$ au-delà de laquelle les fibres présenteraient une pathogénicité. Toutefois, les MWCNT étudiés avaient une longueur de 2 et $13\ \mu\text{m}$, sans aucun autre échantillon entre les deux.

Donaldson et al. (2010) ont ainsi proposé un modèle schématisé comparant la réponse d'un macrophage à des fibres d'amiante et à des CNT avec une distinction entre les CNT enchevêtrés et les CNT rigides (**Figure 21**). Dans une étude suivante (Tran et al. 2011) des précisions sont apportées sur le modèle, notamment avec la notion de HARN (« high aspect ratio nanoparticles ») ou nanoparticules avec un rapport taille/longueur élevé). En se basant sur les données récoltées pour l'amiante, il serait possible de prédire la toxicité d'une nanofibre connaissant ses caractéristiques de base. Cependant, il est bien précisé que ce modèle reste hypothétique et pourrait conduire à une simplification excessive. Le lien entre les CNT et l'amiante est basé sur une similarité de forme et il faudrait continuer à explorer la similarité de la réponse biologique entraînée. Parmi les problématiques de ce modèle, la question de la métrique de la dose prend toute sa place, puisque pour des CNT de taille inférieure, une dose en masse correspondra à une dose en surface ou nombre bien plus importante. Il demeure difficile de mesurer le diamètre et plus particulièrement la longueur de CNT de manière fiable et exacte. Les outils utilisés sont la microscopie électronique (à balayage : MEB, ou à transmission : MET), l'AFM (« atomic force microscopy » ou microscopie à force atomique) pour lesquels la représentativité de l'échantillon choisi peut être remise en question. En ce qui concerne la longueur des CNT enchevêtrées, il est presque impossible de l'obtenir par ces outils. En outre, la technique de la DLS (« dynamic light scattering » ou diffusion dynamique de la lumière) très utilisée pour la mesure du diamètre hydrodynamique de nanoparticules est basée

sur un modèle théorique de particules sphériques. Elle n'est donc pas utilisable telle quelle pour les CNT.

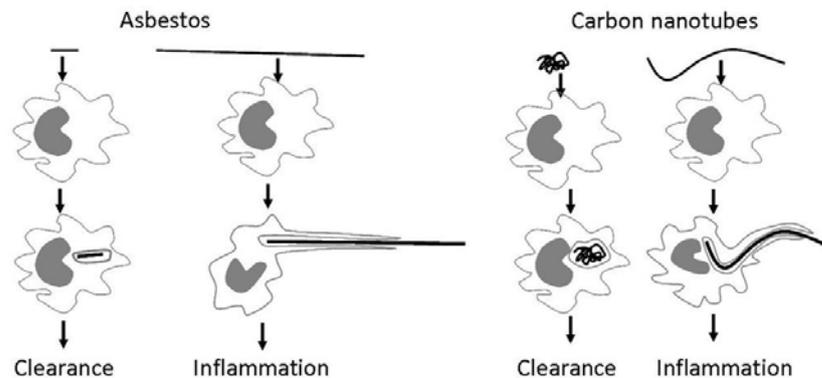


Figure 21 : Modèle de phagocytose frustrée vis-à-vis de fibres d'amiante courtes et longues (à gauche) et de nanotubes de carbone de différentes morphologies (à droite) (Donaldson et al. 2010).

En conclusion, si l'influence sur la toxicité du diamètre et de la longueur reste encore mal comprise, il apparaît que des CNT de taille importante peuvent déclencher un phénomène de phagocytose frustrée s'ils présentent une structure rigide, c'est-à-dire avec peu de défauts structuraux. Ce phénomène doit être pris en compte lors de l'étude de la toxicité de différents types de CNT.

III.3.2. Impuretés catalytiques

Les catalyseurs métalliques utilisés lors de la production des CNT se retrouvent sous forme d'impuretés en surface ou au sein des tubes. Leur rôle dans la réponse biologique reste à clarifier, mais plusieurs études ont démontré un lien entre la toxicité et le taux et la nature de ces impuretés, notamment au niveau de la production de ROS.

En 2011, Turci et al. ont mené une étude sur le rôle du Fe sur la toxicité de fibres d'amiante en tant que modèle pour les HARN. Des fibres de chrysolite ont ainsi été progressivement chargées en Fe (de 0,1 à 1,78 %m). La résonance paramagnétique électronique (RPE) a été utilisée dans cette étude afin de vérifier la capacité des fibres à produire des radicaux libres de façon intrinsèque. Il s'agit d'une technique permettant la détection d'espèces radicalaires en milieu extracellulaire. Le taux des radicaux OH^\bullet et CO_2^\bullet a tout d'abord augmenté avec la concentration en Fe puis diminué après une valeur seuil lorsqu'on continue d'augmenter le taux de Fe (**Figure 22**). Turci et al. se sont basés principalement sur le cycle de Haber-Weiss d'où la réaction de Fenton est issue pour expliquer l'implication du Fe dans la production de ces radicaux.

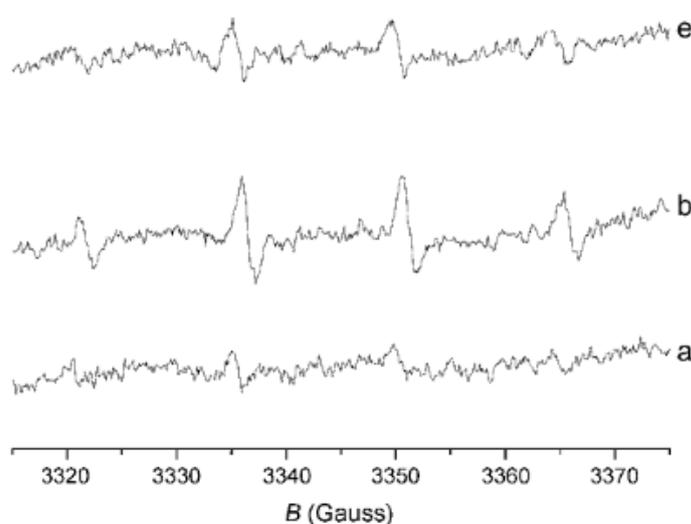


Figure 22 : Spectre RPE présentant la formation de radicaux OH^\bullet en milieu acellulaire de chrysotile a) brute, b) enrichie en Fe 0,67 %m., e) enrichie en Fe 1,78 %m. (Turci et al. 2011)

Une étude récente a mis en évidence le relargage des impuretés sous forme de nanoparticules isolées de SWCNT dans le cytoplasme de macrophages murins (RAW 264.1) (Bussy et al. 2013). L'hypothèse soutenue par ce travail est que l'acidité des vésicules intracytoplasmiques facilite la libération des impuretés. Il a été vérifié qu'il n'y avait aucun détachement des impuretés de fer dans le milieu extracellulaire après 20 min de dispersion par ultrasons. L'addition de concanamycine A inhibant l'acidification intracellulaire diminuait la quantité de particules de Fer libérée confirmant ainsi leur hypothèse. Pour Ge et al. (2012) en revanche les impuretés métalliques peuvent se dissoudre dans des milieux biologiques de synthèse reproduisant les compositions des fluides intestinaux, gastriques ou pulmonaires. Une augmentation de la cytotoxicité a été observée avec l'augmentation du taux d'impuretés de MWCNT (de types différents, riches en Fe ou en Ni) mais aussi des fluides dans lesquels les CNT avait été plongés pendant 6 mois. Les CNT riches en Fe produisaient des radicaux libres en milieu extracellulaire, mais après exposition sur des cellules épithéliales humaines (A549) ils n'ont néanmoins pas provoqué de stress oxydant. Kagan et al. (2006) au contraire, n'ont pas détecté de formation de radicaux libres par RPE mais la présence d'impuretés de fer influençait le stress oxydant cellulaire lors de contacts avec des RAW 264.1. Dans une tendance identique, Meng et al. (2013) ont conclu à un rôle prépondérant du Fe dans la toxicité neuronale.

La présence d'impuretés métalliques autres que le fer peut aussi conduire à des effets identiques. En effet, la réaction de Fenton et les réactions associées peuvent aussi être catalysées par d'autres cations métalliques. Pulskamp et al. (2007) ont observé une production radicalaire en RPE dépendante du type d'impuretés (principalement Co, Mo ou Ni et Fe) et un

stress oxydant sur des cellules A549 et des macrophages de rats (NR8383) déclenché uniquement par les SWCNT et MWCNT non purifiés.

Il est possible de purifier les CNT par traitement acide ou par traitement thermique à haute température. Le traitement à l'acide est couramment utilisé par les industriels producteurs de CNT soucieux d'élargir leur gamme de produits. Chauffer les CNT dans un mélange d'acides forts (généralement HNO_3 , H_2SO_4 à 100°C) permet de les purifier des impuretés catalytiques, mais aussi en fonction du temps de traitement, de greffer des groupements acides en surface (voir Chapitre 1, III.3.4.). Un recuit à haute température sous atmosphère réductrice (Argon généralement) permettrait de vaporiser les impuretés métalliques à partir de 1500°C et de réduire le taux de défaut de structure lorsque le palier est supérieur à cette température (Bougrine et al. 2001; Chen et al. 2008, voir Chapitre 1, III.3.3.).

La présence d'impuretés métalliques semble donc induire un stress oxydant. Il pourrait donc exister deux types de sources d'espèces radicalaires : production intrinsèque aux CNT liés à la présence d'impuretés, et production par les cellules suite à leur contact avec des CNT. Afin d'obtenir plus d'information sur ces mécanismes, nous allons dans cette thèse, étudier l'impact de la purification de CNT par voie chimique ou thermique sur la réponse cellulaire, et notamment sur le stress oxydant.

III.3.3. Défauts et désordre structurel

Les CNT ont une structure idéale composée d'atomes de carbone hybridés sp^2 reliés sous forme d'hexagones. L'hybridation sp^2 du carbone permet à l'atome de former quatre liaisons covalentes avec les atomes voisins. Un réseau de carbone hybridé sp^2 est théoriquement plan (comme pour un feuillet de graphène par exemple). La **Figure 23** expose à gauche la forme théorique des orbitales atomiques de ce carbone sp^2 , et à droite leur forme contrainte due à la géométrie particulière non-plane des CNT. Dans une conformation non contrainte, les orbitales atomiques adoptent la géométrie la plus symétrique possible (vers le haut, vers le bas, vers l'avant, vers l'arrière séparées par des angles Θ de 90°). Dans la conformation contrainte, les angles sont supérieurs à 90° , augmentant la réactivité des CNT avec leur rayon de courbure. Ce phénomène est appelé pyramidalisation (Chen et al. 2003). La majorité des défauts de structure des CNT impliquent une ré-hybridation des carbones sp^2 en carbones sp^3 dont la structure en 3 dimensions forme des irrégularités dans l'alignement hexagonal.

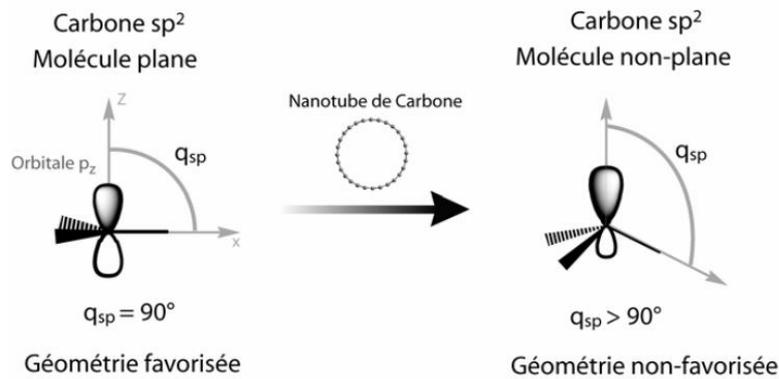


Figure 23 : Géométrie d'un carbone sp^2 dans un système plan (feuille de graphène) et courbé (nanotubes de carbone) (Cabana 2010).

Les défauts des CNT les plus communs sont les lacunes, et les défauts de type Thriwer-Stone-Wales (paire d'heptagone-pentagone) (**Figure 24**). Une classification plus complète est donnée en **Tableau 4**. Dans ce classement, les impuretés catalytiques et les groupements fonctionnalisés sont considérés comme des défauts au sens large. Le terme défauts de structure est utilisé pour désigner des CNT aux structures très particulières : en « bambou » ou en « chevron » (**Figure 25**). Dans ce manuscrit, nous utiliserons le terme de défaut de structure pour désigner directement les défauts de la structure cristalline (défauts intrinsèques localisés et défauts apportés par les traitements post-production).

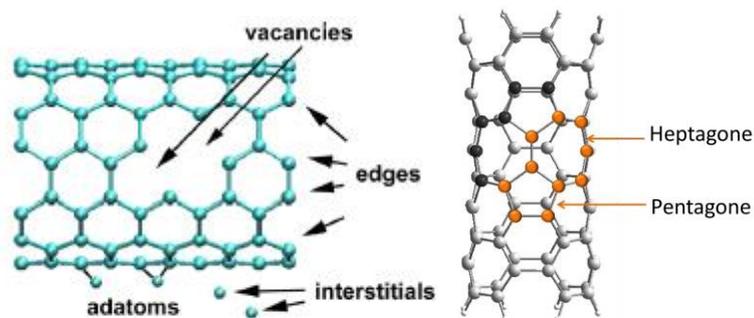


Figure 24 : Défauts de structure des CNT les plus communs. A gauche, « vacancies » : lacunes, « edges » : arêtes, « adatoms » : adatoms, « interstitials » : carbone interstitiels (Lehman et al. 2011). A droite, défaut de Thriwer-Stone-Wale (Galano et al. 2010).

Tableau 4 : Classement des principaux défauts et désordres structuraux des nanotubes de carbone (d'après Collins 2010)

Intrinsèques	Localisés	Lacunes	Peu stables, conduisant à la formation d'adatoms, de carbone amorphe ou de graphite.
		Carbone interstitiels	/
		Rotation et cycles non-hexagonaux	Défauts de type Thrower-Stone-Wales (2 paires d'heptagone-pentagone), 1 paire d'heptagone-pentagone, heptagones et pentagones isolés
	Non localisés	Carbones mésoscopiques	Feuillets de graphite
		Autres composants	Contamination : impuretés catalytiques métalliques
		Défauts de structure	Structure en « bambou », structure en « chevron »
		Dopage	Généralement intentionnel, substitution d'un carbone par un azote ou un bore.
Extrinsèques	Environnementaux	Molécules adsorbées	A l'air libre : généralement H ₂ O, Na ⁺ , H ⁺ En suspension : protéines, tensio-actifs...
		Influence du substrat	Aide éventuelle à l'adsorption des molécules
	Introduits par traitement	Fonctionnalisation	Fonctionnalisations covalentes, lacunes et défauts de type Thrower-Stone-Wales
		Traitement mécanique	Lacunes principalement

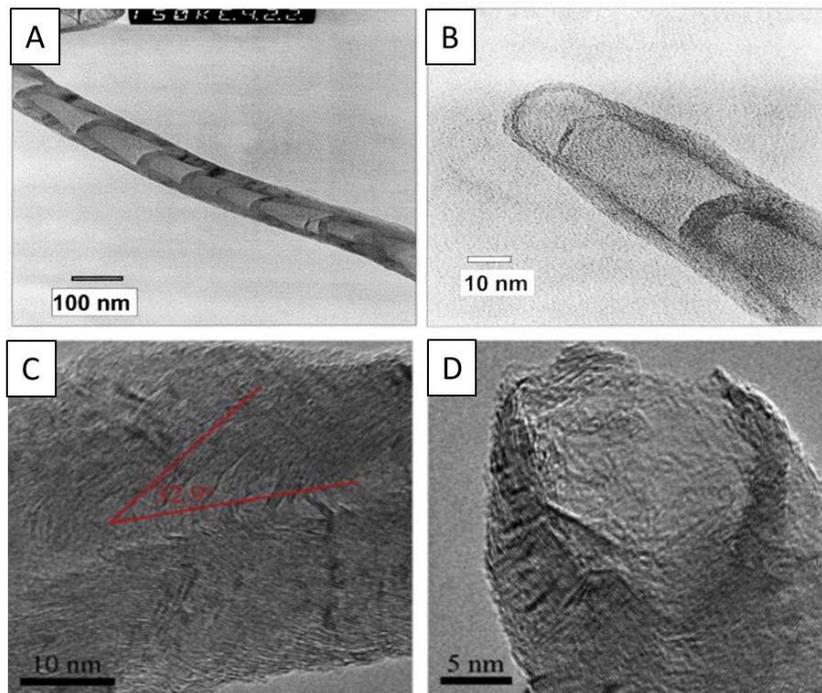


Figure 25 : Images de microscopie électronique à transmission de haute résolution (HR-TEM), A) et B) nanotubes de carbone avec une structure en « bambou » (Lee et al. 2000), C) et D) nanotubes de carbone avec une structure en « chevron » (Cheng et al. 2013)

Le taux de défauts de structure peut être analysé par spectroscopie Raman. Le spectre Raman des CNT présente deux principaux pics : le pic D vers 1340 cm^{-1} lié principalement au carbone sp^3 , et le pic G vers 1570 cm^{-1} lié principalement au carbone sp^2 . Le rapport de l'aire sous les pics I_d/I_g donne une indication du taux de désordre : plus I_d/I_g est élevé, plus le taux de défauts structuraux est important (Arepalli 2004; Lehman et al. 2011; Belin & Epron 2005).

Afin de réduire le taux de défauts de structure notamment pour assurer une meilleure conductivité électrique, les CNT peuvent être recuits à haute température. Sous une atmosphère inerte (gaz Ar), une température supérieure à 1600 ou 1800°C doit être atteinte afin d'observer des changements structuraux (Chen et al. 2008; Bougrine et al. 2001) la durée de traitement importe peu (de 30 min à quelques heures généralement). Ce traitement va aussi permettre de cristalliser le carbone amorphe éventuellement présent au sein de la poudre, et de purifier les CNT des impuretés catalytiques. A notre connaissance, une seule étude a aujourd'hui étudié l'impact biologique des défauts de structure de façon indépendante de la purification. Cette étude a été publiée dans deux articles jumeaux (Muller et al. 2008; Fenoglio et al. 2008) et établissait une comparaison des effets sur la toxicité de MWCNT bruts, recuits à 600°C , broyés puis recuits à haute température et de MWCNT recuits à haute température puis broyés. Les résultats montraient après recuit haute température une diminution de la cytotoxicité, de la génotoxicité, de l'inflammation *in vitro* et de la toxicité aigüe *in vivo*. Ces effets disparaissaient

après broyage des MWCNT recuits. Les auteurs ont donc conclu à une influence des défauts de structure sur la toxicité ayant tenté de modifier uniquement ce paramètre. Le stress oxydant n'a pas directement été évalué, toutefois, des mesures en RPE ont souligné un effet « scavenger » c'est-à-dire une diminution de la quantité de ROS dans le milieu due à la présence de CNT (Muller et al. 2008; Fenoglio et al. 2008). Ce phénomène pourrait venir de l'adsorption des ROS en surface des CNT. Il est plus important lorsque les CNT ont des défauts de structure plus nombreux. Cette aptitude a aussi été observée par Porter et al. (2010). L'influence des défauts de structure sur cette capacité d'adsorption a été étudiée plus en avant par Shukla & Mishra (2010) et Galano et al. (2010) grâce à la simulation informatique. Ces deux études ont conclu à une corrélation entre l'adsorption de radicaux hydroxyles et le type de défauts de structure. Pour Shukla & Mishra les SWCNT comportant des défauts de type Throrer-Stone-Wales sont plus réactifs que les SWCNT sans défauts et que les SWCNT avec des lacunes. Pour Galano et al., les SWCNT comportant des adatoms et des lacunes avec liaisons instables sont encore plus réactifs envers les radicaux libres que les SWCNT comprenant des défauts de type Throrer-Stone-Wales ou des lacunes sans liaisons instables.

Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer l'impact global des défauts de structure sur la toxicité des CNT, mais aussi sur leur effet « scavenger ». Une étude sera réalisée dans cette thèse sur l'impact biologique d'un recuit haute température sur la cytotoxicité, la réponse pro-inflammatoire et la production de ROS. Une étude plus complète sur l'impact sur le stress oxydant est en cours de réalisation.

III.3.4. Fonctionnalisation de surface

Il est possible de modifier la chimie de surface des CNT par différents traitements de post-production. Les intérêts sont multiples : améliorer la dispersion en milieu aqueux, charger positivement ou négativement les CNT, les purifier, greffer des groupements d'intérêt pour des applications spécifiques (ex : anticorps, fluorophores, protéines). Deux approches sont principalement utilisées : fonctionnalisation covalente avec une liaison chimique forte, ou non-covalente avec des liaisons faibles de type Van der Waals, hydrogène, liaison π - π . L'espace intérieur des CNT peut aussi être utilisé pour une fonctionnalisation endoédrique, ou « nano-capillaire » (**Figure 26**).

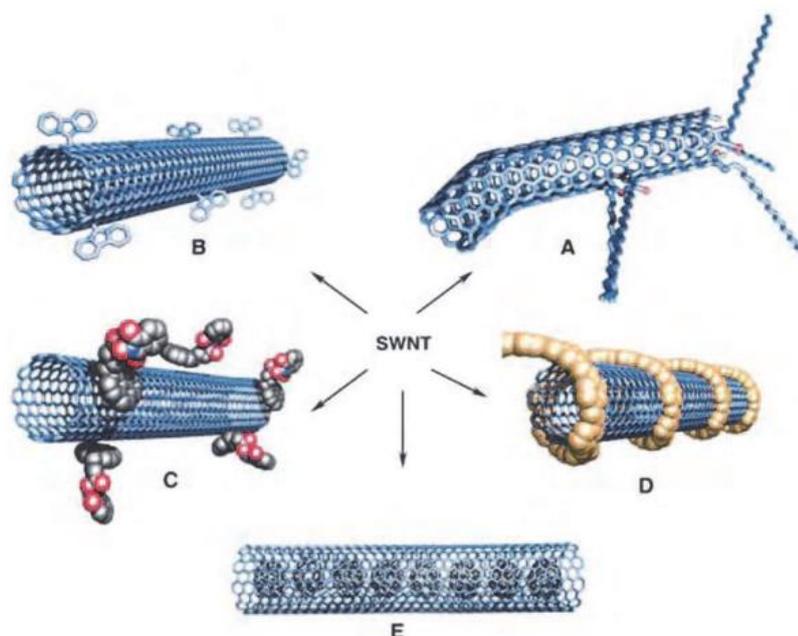


Figure 26 : Représentation schématique des classes possibles de SWCNT fonctionnalisés : A) fonctionnalisation covalente sur défauts de structure, B) fonctionnalisation covalente sur parois, C) fonctionnalisation non-covalente avec un tensio-actif, D) fonctionnalisation non-covalente avec un polymère, E) fonctionnalisation endoédrique (Jeon et al. 2011)

Comme présenté dans le paragraphe précédent (Chapitre 1, III.3.3.III.3.3. Défauts et désordre structurel) la forme cylindrique des CNT entraîne une tension des orbitales sp^2 du carbone. Une fonctionnalisation covalente permet aux orbitales sp^2 de se transformer en sp^3 , réduisant ainsi la tension. Plus la courbure des nanotubes est importante, c'est-à-dire plus le diamètre est petit, plus la tension est importante. C'est pourquoi les MWCNT seront plus réactifs et plus enclins à être fonctionnalisés que les SWCNT (Voiry 2010).

L'occurrence des études sur les fonctionnalisations les plus courantes, toutes techniques de fonctionnalisation confondues, est présentée en **Figure 27**. La fonctionnalisation acide a été jusqu'à présent la plus étudiée. Il s'agit d'une fonctionnalisation covalente par attaque acide par mélange d' HNO_3 , H_2SO_4 ou $KMnO_4$, chauffé à reflux ou traité par ultra-sons (Rosca et al. 2005; Chen et al. 2012; Landois 2008). Des groupements acides, principalement carboxyles, mais aussi hydroxyles et carbonyles, ainsi que d'autres groupements oxygénés comme les phénols, quinones et lactones, sont greffés en surface au niveau des défauts de structure (**Figure 28**). Ces groupements permettent de diminuer l'hydrophobicité des CNT et sont des sites réactifs pouvant servir de précurseurs pour des fonctionnalisations secondaires à base de polystyrène par exemple (Song et al. 2010). En outre, l'attaque acide purifie les CNT des impuretés catalytiques, mais elle est aussi responsable de la création de nombreux défauts de structure. Les CNT sont en effet dégradés et peuvent être raccourcis, affinés ou même perdre leur structure tubulaire (Kosynkin et al. 2009; Wepasnick et al. 2011).

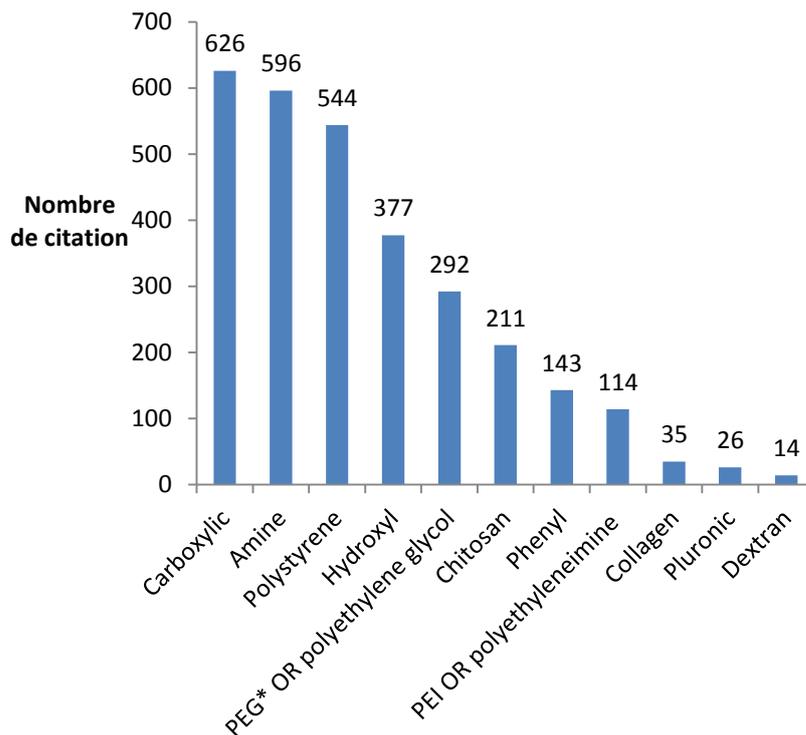


Figure 27 : Nombre d'articles recensés sur les principaux types de CNT fonctionnalisés. Recherche dans Word of Knowledge pour "carbon nanotubes functionalization" + le type de fonctionnalisation (le 24/01/2014)

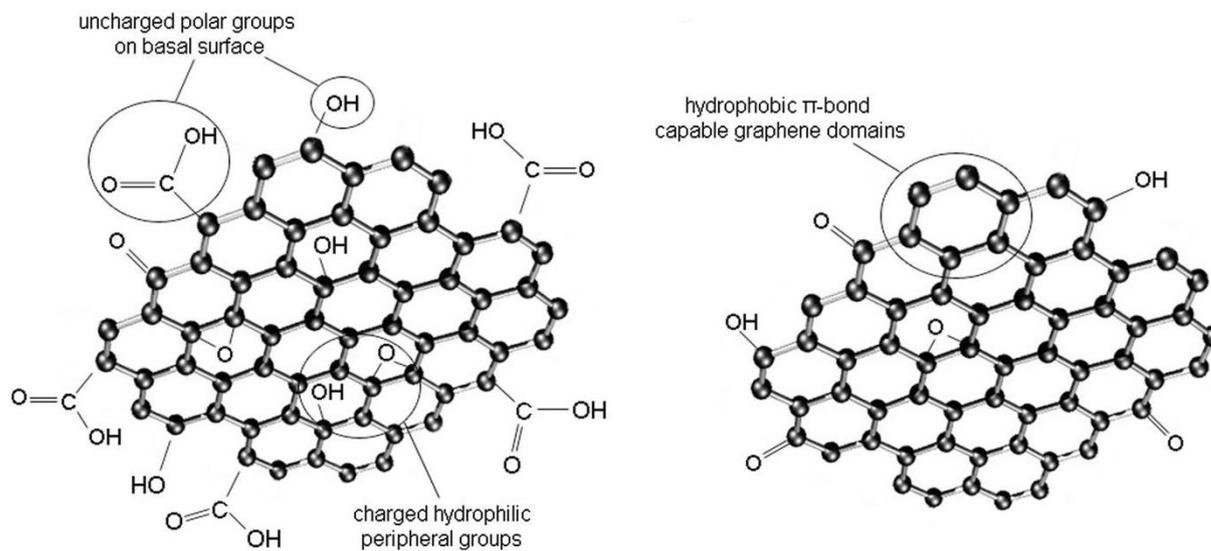


Figure 28 : Groupements acides greffés en surface d'un feuillet de graphène après fonctionnalisation acide (Jastrzębska et al. 2012)

Beaucoup des fonctionnalisations de surface ont été présentées comme améliorant la biocompatibilité des CNT. Cependant, les effets réels sur la toxicité des CNT restent à ce jour mal compris, et les réponses cellulaires observées peuvent varier en fonction des études.

Une attention particulière sera portée sur l'impact biologique de la fonctionnalisation acide. Lorsque l'on compare les effets sur la cytotoxicité de CNT fonctionnalisés à l'acide à ceux des CNT bruts, certaines études ont conclu à un effet protecteur de la fonctionnalisation (Bottini et al. 2006; Gutiérrez-Praena et al. 2011; Dong et al. 2012; Fröhlich et al. 2012), tandis que d'autres ont observé une augmentation de la cytotoxicité (Lorena Montes-Fonseca et al. 2012; Fraczek-Szczypta et al. 2012; T. Zhang et al. 2012; Li et al. 2013). Concernant la réponse pro-inflammatoire, les résultats divergent aussi : les résultats de Dong et al. (2012), ou Zhang et al. (2012) présentaient une augmentation de celle-ci due à la fonctionnalisation acide, ceux de Jain et al. (2011), Li et al. (2013) ou Hamilton, Xiang, et al. (2013) une diminution de l'inflammation et notamment des inflammasomes liée à la présence des groupements acides, et ceux de Lorena Montes-Fonseca et al. (2012) pas de différence significative avec des CNT bruts. Des contradictions concernant le stress oxydant sont, de la même manière, présentes lorsque l'on parcourt la littérature : augmentation des espèces oxydantes de l'azote (T. Zhang et al. 2012), ou au contraire disparition de la peroxydation lipidique et de l'activité d'antioxydant (Jain et al. 2011). Fröhlich et al. (2012) ont pris le parti de diversifier le type de CNT fonctionnalisés et les lignées cellulaires pour évaluer l'influence de ces paramètres sur la toxicité. L'étude a été conduite sur 8 CNT différents : SWCNT bruts et fonctionnalisés acides, MWCNT bruts et fonctionnalisés à l'acide pour 3 tailles (< 8 nm, 20-30 nm, > 50 nm). Pour le test de cytotoxicité MTS, 6 lignées cellulaires ont été utilisées : EAhy926 (cellules endothéliales humaines), A549 (cellules épithéliales alvéolaires humaines), HepG2 (hépatome humain), DMBM-2 (macrophages murins de moelle osseuse), V79 (fibroblastes pulmonaires de hamster chinois), et TK-6 (lymphoblastes humains). L'intensité des réponses a varié selon la lignée cellulaire, mais les tendances restent comparables lorsqu'une réponse est observée (**Figure 29**). Les CNT les plus fins présentaient une cytotoxicité plus élevée que les CNT les plus épais, et la fonctionnalisation acide semblait diminuer très légèrement l'activité mitochondriale. Des tests complémentaires ont suggéré une absence de lien entre cytotoxicité et stress oxydant pour ces CNT. Par ailleurs, d'autres tests de cytotoxicité ont été effectués afin de compléter cette étude. Des mécanismes de réponses différents ont été identifiés par coloration YoPro-1/PI avec les observations suivantes: une plus forte nécrose déclenchée par les CNT fins ou fonctionnalisés à l'acide, et plus forte apoptose déclenchée par les CNT épais. Néanmoins, aucune conclusion significative n'a pu être tirée des tests basés sur la détection de la LDH, de l'ATP et la quantification de l'ADN. Les réponses cellulaires observées dépendraient donc du type de CNT, de la lignée cellulaire et des tests choisis. Pescatori et al. (2013) ont, de même, démontré qu'en fonction du type de MWCNT-COOH (de producteurs différents), certains MWCNT-

COOH peuvent ne déclencher ni cytotoxicité, ni inflammation au contraire d'autres MWCNT-COOH.

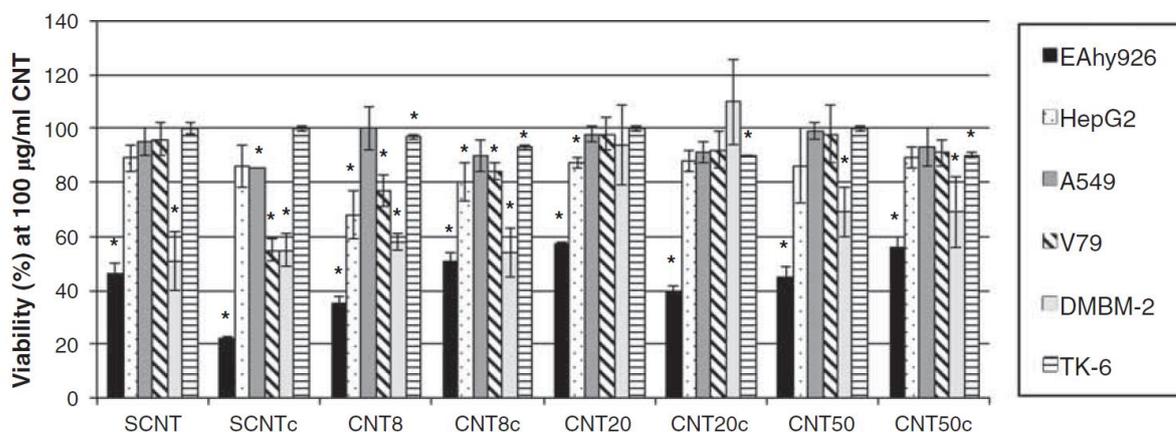


Figure 29 : Comparaison de la cytotoxicité (test MTS) sur différentes lignées cellulaires exposées durant 24h à 100 µg.mL⁻¹ de CNT petits : SCNT, SCNTc (fonctionnalisés à l'acide), CNT8 (diamètre < 8 nm), CNT8c ; de taille moyenne : CNT20 (diamètre de 20 à 30 nm), CNT20c ; et épais : CNT50 (diamètre > 50 nm), CNT50c (Fröhlich et al. 2012).

La fonctionnalisation acide a été présentée comme une approche très prometteuse pour sa capacité à favoriser la biodégradation des CNT. En effet, en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, et notamment de leur taux de défauts de structure et d'une fonctionnalisation acide éventuelle, il est possible de biodégrader les CNT. C'est ce qui a été mis en avant par plusieurs études *in vitro* utilisant un milieu acellulaire riche en peroxydase et en peroxyde d'hydrogène.

Différentes peroxydases ont été étudiées. Ce sont des enzymes catalysant des réactions d'oxydation de type :



La peroxydase de raifort (Horseradish peroxidase ou HRP en anglais) a été la première étudiée. La peroxydase de raifort est une enzyme provenant de la plante du même nom. Mettre en suspension des SWCNT fonctionnalisés à l'acide dans un mélange de HRP et H₂O₂ pendant plusieurs jours permet de les dégrader partiellement, voire totalement au bout de plusieurs semaines (Allen et al. 2008). Les SWCNT bruts semblent plus difficiles à dégrader dans cette suspension (Allen et al. 2009; Liu et al. 2008). Dans l'étude de Russier et al. (2011) il est démontré que les SWCNT et les MWCNT de plus faibles diamètres se dégradent plus vite que les MWCNT de diamètre important. L'étude de Zhao et al. (2011) fournit une explication en

décrivant un mécanisme de dégradation feuillelet par feuillelet avec comme point d'attaque les défauts de structure des CNT. Les CNT fonctionnalisés à l'acide sont dégradés d'autant plus rapidement et efficacement que le temps de traitement a été long permettant ainsi de créer plus de sites de défauts structuraux.

Dans un second temps, la potentielle dégradation des CNT par des peroxydases animales a été étudiée. La myéloperoxydase humaine (MPO) serait aussi capable de dégrader des SWCNT fonctionnalisés à l'acide. Une confirmation *in vitro* chez des neutrophiles et des macrophages a été réalisée. Les neutrophiles ont dégradé en partie les SWCNT fonctionnalisés, tandis que la dégradation était très faible voire inexistante chez les macrophages, pauvres en MPO. Une étude complémentaire *in vivo* a été conduite chez des souris après aspiration pharyngée ou inhalation. Les SWCNT fonctionnalisés dégradés n'ont induit aucune inflammation significative alors que les SWCNT fonctionnalisés non dégradés ont induit une réponse inflammatoire et la formation de tissus granulaires. D'autres peroxydes ont été étudiées avec des taux de dégradation différents (Kotchey et al. 2013; Andón et al. 2013; Vlasova et al. 2011), en soulignant toutefois que les systèmes antioxydant empêcheraient une biodégradation efficace des CNT dans le sang. Les conditions utilisées dans ces tests étant extrêmes, d'autres d'études *in vitro* seraient nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeux.

L'impact sur la toxicité et la biodégradation des CNT par d'autres types de fonctionnalisation de surface sont également incertaines. La cytotoxicité provoquée par des CNT fonctionnalisés avec des fonctions amines ou hydroxyles varie en effet selon les études : non significative (Ali-Boucetta, et al. 2011), ou variant selon les tests (Song et al. 2013; Ursini et al. 2012). Le polyéthylène glycol (PEG) est couramment utilisé dans le milieu biomédical, il est facilement éliminé par voie rénale, et permet de diminuer l'hydrophobicité d'un élément. Il a donc naturellement été envisagé comme fonctionnalisation pour des applications en biomédecine des CNT. Cependant, les réponses cellulaires entraînées n'en font pas clairement un meilleur candidat que les CNT bruts ou fonctionnalisés à l'acide. L'étude de Zhang et al. (2012) a comparé les impacts de MWCNT bruts, fonctionnalisés à l'acide (MWCNT-COOH) et fonctionnalisés au PEG (MWCNT-PEG) sur des macrophages murins (RAW 264.7). Après 24h d'exposition, pour des concentrations classiques de 25 à 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, les MWCNT bruts engendraient la plus haute cytotoxicité, tandis que la fonctionnalisation au PEG et à l'acide dans une moindre mesure semblait la diminuer. Les MWCNT-COOH provoquaient une réponse pro-inflammatoire et un stress oxydant plus importants que les deux autres types de MWCNT. L'étude de Jiang et al. (2013) concluait aussi à une cytotoxicité, une réponse pro-inflammatoire et un stress oxydant moins élevés pour des MWCNT-PEG que pour des MWCNT-COOH (même lignée cellulaire et vérification de la cytotoxicité sur une lignée primaire, en concentrations équivalentes 0-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Pour Li et al. (2013) en revanche, les MWCNT-PEG ont présenté une cytotoxicité et une réponse pro-inflammatoire plus forte que les MWCNT-COOH, mais bien plus faible que les MWCNT bruts, ou fonctionnalisés au NH_2 ou

polyéthylèneimine (PEI) (lignées BEAS-2B et THP-1, 60-120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Il est à noter que le devenir *in vivo* de CNT-PEG semble dépendre de la masse moléculaire de la molécule (Liu et al. 2008; Yang et al. 2013) qui influence sans doute aussi les réponses cellulaires. De nombreuses autres fonctionnalisations ont été expérimentées, mais aucune ne semble garantir une biocompatibilité quel que soit le type de CNT étudié.

Malgré le nombre toujours plus important d'études, l'impact sur la toxicité biologique d'une fonctionnalisation de surface de CNT reste donc encore à éclaircir. Il est aussi important d'identifier les caractéristiques physico-chimiques influençant cet impact. Ainsi, au cours de cette thèse, l'impact d'une fonctionnalisation acide de CNT sur la réponse cellulaire de macrophages sera étudié, en distinguant les effets de la présence de groupements acides, des effets de la purification.

III.3.5. Morphologie : comparaison avec le nano-graphite et le noir de carbone

Le graphène est souvent considéré à l'égal des CNT comme un nanomatériau très prometteur. Ses propriétés mécaniques, électroniques et thermiques sont très proches de celles des CNT. Le graphène possède notamment un module d'Young de 0,5 à 1 TPa et une conductivité thermique supérieure à 5000 W.mK^{-1} (1-1,4 et ≈ 6000 respectivement pour les SWCNT) (Soldano et al. 2010). Obtenir un feuillet de graphène isolé est néanmoins encore un défi que peu de laboratoires ont réussi à surmonter. Novoselov et al. (2004) ont été les premiers à publier sur la préparation et l'étude d'un feuillet de graphène isolé. La plupart des industriels proposent aujourd'hui du nano-graphite (NG) d'une épaisseur nanométrique mais composé de quelques feuillets de graphène (**Figure 30**). Un feuillet de graphène mesure de 0,65 à 0,75 nm d'épaisseur et l'espace inter-feuillet mesure environ 0,34 nm (Schniepp et al. 2006). Il est donc possible d'estimer le nombre de feuillets composant un NG. Mullick Chowdhury et al. (2013) ont par ailleurs proposé une technique permettant de produire du NG par l'ouverture longitudinale de MWCNT.

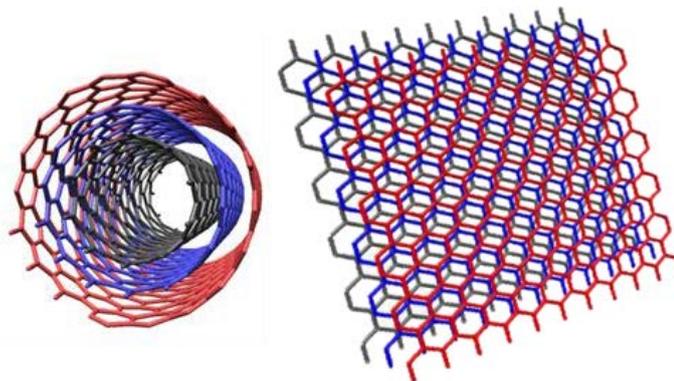


Figure 30 : Schéma de la structure de nanotubes de carbone et de nano-graphite

Le noir de carbone (ou CB pour « carbon black » en anglais) est, au contraire des CNT et du NG, un matériau bien connu et utilisé traditionnellement depuis des années comme pigment ou comme renforcement mécanique dans les pneumatiques. Ce n'est que depuis peu qu'il est considéré comme un nanomatériau. La plupart des types de CB ayant des particules primaires de diamètre moyen entre 10 et 100 nm, ils entrent de fait sous la définition ISO (ISO/TS 27687:2008 2008). Ses effets sur la santé sont bien caractérisés par rapport aux autres nanomatériaux. L'agence internationale pour la recherche sur le cancer a classifié le CB comme potentiellement carcinogène pour les humains (groupe 2B) (IARC 2010). Une des études prises en compte dans ce rapport démontre que des cancers pulmonaires apparaissaient chez des rats exposés au CB. Ces cancers étaient précédés de signes d'inflammation, de mortalité cellulaire et de stress oxydant. Ces signes précurseurs sont souvent retrouvés lors d'études *in vitro*. Toutefois, si le CB est souvent utilisé comme témoin dans les études de toxicité des CNT et des NG, il est alternativement utilisé comme témoin négatif (Lam et al. 2004; Bottini et al. 2006; Schinwald et al. 2011) ou positif (Pulskamp et al. 2007; Di Giorgio et al. 2011) pour un même type de CB (Printex® 90) pour les études de Lam, Schinwald, Pulskamp et Di Giorgio. Ceci met bien en évidence les contradictions qui subsistent dans ces études.

Il est de plus difficile d'extraire des conclusions globales des études de toxicité du graphène ou nano-graphite. A l'image des CNT, il n'existe pas une toxicité unique du graphène ou NG. La réponse biologique varie en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Le graphène ou les NG semblent entraîner une cytotoxicité peut-être liée à un mécanisme d'apoptose (Li et al. 2012; Mao et al. 2013; Zhou et al. 2012). De notre bilan, seule l'étude de Schinwald et al. (2011) a étudié les autres réponses cellulaires. Une cytotoxicité, une réponse pro-inflammatoire et un stress oxydant ont été observés après 24 h d'exposition de monocytes leucémiques humains (THP-1) à 1 à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NG. Les résultats *in vivo* ont confirmé le déclenchement de mécanismes inflammatoires ainsi que des signes de phagocytose frustrée.

La technique de Hummers (Hummers & Offeman 1958) est l'une des plus couramment utilisées pour la production de graphène ou NG. Cette technique consiste en l'exfoliation par oxydation de feuillets de graphites en feuillets de graphène ou nano-graphite oxydé (GO ou NGO) plus fins et moins larges. De nombreux groupements acides sont présents en surface, comme pour du graphène ou du NG fonctionnalisé à l'acide. Nous nous sommes préalablement intéressés à l'impact biologique d'une fonctionnalisation acide de CNT. Il serait, de même, intéressant d'explorer l'impact de la présence de groupements acides en surface de NG ou graphène sur leur toxicité. Différentes études comparent la réponse cellulaire entraînée par des graphènes ou NG oxydés, fonctionnalisés, bruts, ou réduits. Une des techniques pour obtenir du graphène ou NG avec un minimum de groupements acides en surface, est en effet de réduire les GO ou NGO par voie chimique (ajout d'hydrazine) (Das et al. 2013; Wojtoniszak

et al. 2012) ou hydrothermale (Liao et al. 2011). Pour Lammel et al. (2013) après exposition de cellules carcinomateuses hépatiques (Hep G2) à du GO et du graphène fonctionnalisé à l'acide, aucune différence de réponse cellulaire n'a été observée. Das et al. (2013) et Duch et al. (2011) ont observé une réponse cellulaire plus forte pour le GO que le graphène brut. A l'inverse, Liao et al. (2011), Sasidharan et al. (2011), Sasidharan et al. (2012), et Wojtoniszak et al. (2012) ont observé une réponse plus faible déclenchée par le GO par rapport au graphène brut. Il n'est donc pas possible pour l'instant de conclure de manière certaine de l'influence sur leur toxicité des groupements acides en surface de graphène ou NG.

Peu d'études ont comparé les effets des CNT et du graphène ou NG. Le **Tableau 5** résume les principales conclusions des études sur le sujet. Les réponses biologiques semblent être supérieures ou égales pour les CNT par rapport au graphène ou nano-graphite. Toutefois les résultats restent peu représentatifs et reproductibles. Seul Wan et al. (2013); Zhang et al. (2010) ont comparé des SWCNT fonctionnalisés à l'acide avec du GO. Leurs conclusions sont toutefois opposées avec une cytotoxicité plus élevée des GO pour Wan et al., et plus basse pour Zhang et al. Les caractéristiques physico-chimiques de ces nanomatériaux pouvant varier fortement, il convient de diminuer au possible les différences d'état de surface, et de purification afin de pouvoir conclure à un effet de morphologie.

Dans cette thèse, nous comparerons la toxicité biologique de NG, de CNT et de CB fonctionnalisés donc présentant une chimie de surface similaire. L'impact d'une telle fonctionnalisation sur les différents types de nanomatériaux de carbone sera elle aussi évaluée.

Tableau 5 : Synthèse des études comparatives des nanotubes de carbone (CNT, CNTf si fonctionnalisés à l'acide), du graphène ou nano-graphite (G et NG respectivement, éventuellement oxydés : GO et NGO respectivement)

Publication	Nanomatériaux	Caractérisation physico-chimique	Mode opératoire	Cytotoxicité et toxicité <i>in vivo</i>	Inflammation	Stress Oxydant	Autre	Conclusions
(Ma-Hock, et al. 2013)	MWCNT NG GNP : Plaquettes de graphène CB	MEB, diamètre moyen : MWCNT 15 nm, CB 50-100 nm, graphène 9nm, GNP 100nm XPS : pas d'impureté dans les MWCNT, impuretés soufrées et d'oxydation pour le NG et les GNP Raman : Id/Ig de 1,4 pour le NG, 0,01 pour les GNP	Rats Wistar mâles Inhalation tête-nez, 0,5-2,5 mg.m ⁻³ , suivi sur 7-28 jours	Poids ok sauf pour les rats exposés aux MWCNT Hématologie ok	MWCNT : augmentation du nombre total de cellules, de protéines, de lymphocytes, et de neutrophiles. Diminution du nombre de macrophages. Rémission à 28 jours. Microgranulomes. NG : augmentation du nombre total de cellules, de protéines. Microgranulomes GNP: pas de changement excepté l'activité du gène gpt CB: pas de changement	/	MWCNT : Fibres observées dans les macrophages. NG et GNP : agglomérats observés dans les macrophages	Inflammation s locales uniquement. MWCNT > NG > GNP > CB

<p>(Wan et al. 2013)</p>	<p>SWCNTf GO</p>	<p>AFM : GO épaisseur environ 1 nm, MET: diamètre moyen des SWCNTf 1-2 nm Potentiel zêta dans le milieu de culture FTIR: présence de groupements acides (COOH) Raman: Id/Ig GO > SWCNTf ICP-MS: SWCNTf Fe 0,056 %m, GO Fe 61 ppb, Co 64 ppb</p>	<p>Macrophages péritonéaux primaires murins 1-50 µg.mL⁻¹, 24 h</p>	<p>LDH : GO > SWCNTf dose-dépendance Déstabilisation de la membrane lysosomale</p>	<p>/</p>	<p>/</p>	<p>MEB : présence de vésicules MET : internalisation Imagerie en fluorescence (transfection parGFP-LC3 plasmide, 24h avant) : réduction des lysosomes avec la concentration Western blot : autophagosomes GO > SWCNTf mais mécanismes endommagés</p>	<p>Les GO induisent plus de réponse que les SWCNTf. Activation d'une autophagolyse</p>
<p>(Yuan et al. 2011)</p>	<p>SWCNT G</p>	<p>AFM : majorité de graphène simple feuillet (0,8 nm), plusieurs centaines de nm de large FTIR : bonne réduction du</p>	<p>HepG2 : cellules humaines de carcinomes du foie Utilisation d'un tensio-actif : 0,2%</p>	<p>MTT : SWCNT perte de 26% de viabilité, 17% pour le graphène</p>	<p>/</p>	<p>/</p>	<p>iTRAQ et MS/MS : quantification de 37 protéines : seuls quelques faibles changement sont détectables pour</p>	<p>Graphène peu cytotoxique par rapport au SWCNT.</p>

		graphène oxydé Raman : diminution de Id/Ig après réduction du graphène	de Tween 80, 1µg.mL ⁻¹ , 48h				le graphène (SWCNT toxiques) y compris pour les protéines indicatrices de stress oxydant.	
(Zhang et al. 2010)	SWCNT G synthétisés par CVD avec un catalyseur Fe- Co/MgO puis purifiés à l'acide	MET : G 100-110 nm de diamètre. SWCNT 0,8-1,2 nm MEB, Raman : G épaisseurs de quelques feuillets AFM : G épaisseur 3-5 nm, 80% de 3- 5 feuillets, 12% de 6-10, et 8% de 1-3 DRX : structure graphite Potentiel zêta dans l'eau : SWCNT -5, 53 mV, G -35,59 mV, milieu de culture : -8,5 mV pour les 2.	Cellules tumorales neuronales : phéochromo cytomes PC12 24h, 0-100 µg.mL ⁻¹ Dilution des SWCNT et G dans le milieu sans sérum	LDH : SWCNT dose-dépendant > G significatif seulement à 100 µg.mL ⁻¹ MTT : G>SWCNT tendance qui s'inverse à forte concentration Caspase 3 : signe d'apoptose uniquement à 16 µg.mL ⁻¹ de G, non significatif pour des doses inférieures ou supérieures	/	ROS : dose- dépendant à 24h > 4h rien à 1h, croissante avec le temps d'exposition pour G	Observation morphologique : cellules intactes	G et SWCNT induisent une toxicité différente : peu de cytotoxicité pour G, mais formation de ROS et peut- être apoptose.

<p>(Zhang, Yin, et al. 2011)</p>	<p>GO marqués au ¹⁸⁸Re</p>	<p>AFM : >70% du graphène à une épaisseur de 1nm, et une largeur de 10-800 nm</p> <p>Raman : désordre structurel visible pour le graphène</p>	<p>Souris 48 Kun Ming, 1-10 mg.kg⁻¹ en intraveineux</p> <p><i>In vitro</i> : Erythrocytes primaires de sang de rat, 10-80 µg.mL⁻¹</p>	<p>A 1 mg.kg⁻¹ pas de pathologie, mais à 10 mg.kg⁻¹ lésions granulaires, œdèmes pulmonaires, et fibrose</p> <p>Microscopie : à 80 µg.mL⁻¹ membranes rompues, hémolyse dose-dépendante</p>	<p>/</p>	<p>/</p>	<p>En 48h distribution du graphène dans les poumons, le foie, la rate, peu dans le cerveau, le cœur et les os.</p>	<p>Plus grand temps de rétention dans le sang pour le graphène que pour les SWCNT et MWCNT.</p>
<p>(X. Zhang et al. 2012)</p>	<p>CNTf : MWCNT fonctionnalisés à l'acide</p> <p>NGO</p> <p>NDf : Nano-diamant-fonctionnalisé à l'acide</p>	<p>MET : CNTf 20-40 nm de diamètre, quelques 10^{aines} de µm de long, NGO 10-100 nm de large</p> <p>FTIR : étude des groupements acides</p> <p>ATG : taux de fonctionnalisation CNTf 11%_m., NGO 9.2%_m., NDf 3%_m.</p>	<p>Cellules HeLa</p> <p>10-100 µg.mL⁻¹, 3-24 h</p>	<p>LDH : réponse dose-dépendante, et fonction du temps CNTf >NGO >NDf</p> <p>Pas de lien avec les ratios d'internalisation cellulaire</p> <p>MTT : réponse dose-dépendante NGO ≥ CNTf >NDf</p>	<p>/</p>	<p>MDA, SOD : NGO > CNTf >NDf</p> <p>ROS: NGO ≥ CNTf >ND</p>	<p>MET (radio-labellisation) : liés à la membrane ou internalisation en 2 h, NDf 26% CNTf 13% > NGO 8%</p>	<p>Réponse cellulaire similaire pour les CNTf et les NGO</p>

BILAN ETAT DE L'ART :

Toxicité pulmonaire *in vitro*

Faire la synthèse de l'état de l'art sur la toxicité *in vitro* des CNT revient en grande partie à faire le constat des questions en suspens sur un nanomatériau aux caractéristiques physico-chimiques parfois très diverses et aux impacts biologiques complexes.

Cependant, quelques tendances se sont dégagées de ce bilan bibliographique. Premièrement, les CNT les plus longs et les plus rigides semblent entraîner une toxicité plus importante, sans doute via un mécanisme de phagocytose frustrée. De plus, les impuretés catalytiques métalliques ont un rôle dans la production de radicaux libres et favoriseraient le stress oxydant. Ces deux conclusions provisoires rejoignent celle de Donaldson et al. (2006) dans sa revue sur la toxicologie pulmonaire. En outre, les défauts de structure des CNT augmentent les capacités « scavenger » des CNT, c'est-à-dire la capacité d'entraîner une diminution des radicaux libres, avec une influence encore incertaine sur la réponse cellulaire. Des études complémentaires seraient nécessaires afin de comprendre les raisons de la diminution partielle de la toxicité ou de la biopersistance dues à certaines fonctionnalisations de surface avec un fort enjeu industriel, comme la fonctionnalisation acide ou au PEG. Enfin, la comparaison des CNT avec le graphène et le noir de carbone reste encore difficile, mais une légère tendance semble se dessiner avec une toxicité biologique plus importante provoquée par les CNT. Toutefois ces conclusions doivent encore se vérifier pour un état de surface identique.

IV. Synthèse et objectifs

Il existe un consensus dans la communauté scientifique sur la nature multifactorielle de la toxicité des CNT. Il est aujourd'hui impossible de prédire avec précision la toxicité pulmonaire d'un type de CNT. Face à la pression du marché et à l'exigence réglementaire, il n'est pas envisageable en termes de délais et de coûts de réaliser des études de caractérisation physico-chimiques et biologiques au cas par cas pour chaque type de CNT. Choi et al. (2009) avait ainsi calculé que le coût pour les Etats-Unis serait au moins \$249 millions pour tester les nanoparticules existantes à l'époque et que cela demanderait 34 à 53 ans de travaux de recherche. Une nouvelle stratégie prend peu à peu place dans ce contexte, basée sur une approche dite « safer by design » (Kelty 2009; Gaffet 2012). Cette approche vise à réduire les risques dès la conception des produits en choisissant des paramètres physico-chimiques minimisant leur toxicité. Il s'agit donc d'orienter la recherche de manière à identifier les paramètres pouvant diminuer la réponse biologique. La toxicologie est ainsi utilisée de manière prédictive afin de gérer les risques en amont de leur développement. L'Anses (2012) souligne toutefois qu'il est indéniablement difficile de faire varier un seul paramètre physico-chimique à la fois, et met en garde contre la possibilité d'effets synergiques entre plusieurs paramètres. Les études mécanistiques à venir devront prendre en considération ces problématiques. De manière complémentaire, par exemple, les modèles QSAR (« quantitative structure-activity relationship » pour relation quantitative structure à activité) permettent d'envisager à moyen terme une approche prédictive de la toxicité d'une particule en fonction de ses propriétés physico-chimiques. Cet outil a néanmoins besoin de nombreuses données expérimentales afin de pouvoir construire un modèle mathématique fiable et robuste.

Dans ce contexte général, cette thèse aura pour principal objectif d'étudier l'impact sur la réponse cellulaire de deux post-traitements industriels :

1. la fonctionnalisation acide : recherche d'une corrélation potentielle avec la taille des CNT ou le type de nanomatériaux à base de carbone,
2. le recuit haute température.

Chapitre 2. Impacts biologiques d'une fonctionnalisation acide

I. Introduction et méthodologie

Ce chapitre se focalise sur l'impact biologique de la fonctionnalisation acide de CNT. Les techniques utilisées pour la caractérisation physico-chimique des poudres brutes et fonctionnalisées, ainsi que pour la caractérisation de la réponse cellulaire, sont présentées en Annexe A1. Méthodes. Les techniques utilisées pour la caractérisation physico-chimique sont :

1. la microscopie électronique à balayage à canon à émission de champ (FEG-MEB),
2. la technique de Brunauer Emmett Teller (BET),
3. la spectrométrie Raman,
4. la spectrométrie de photoélectrons induits par les rayons X (XPS),
5. la spectrométrie de masse de thermodésorption (TDS),
6. la spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES)
7. la mesure de la stabilité des suspensions, du potentiel zêta et du point isoélectrique (pI) par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Le protocole de fonctionnalisation acide (**Figure 31**) a été mis en place suite à l'optimisation d'un protocole classique issu de la littérature. Si plusieurs études utilisent une solution simple d'acide nitrique concentré (Datsyuk et al. 2008; Rosca et al. 2005; Klink et al. 2012), d'autres études lui préfèrent un mélange d'acide nitrique et acide sulfurique concentrés (Boncel et al. 2011; Ang et al. 2000; Jain et al. 2011; Chen et al. 2012) potentiellement plus efficace (Bortolamiol et al. 2014). La proportion d' $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ oscille entre 3:1 et 3:2 en volume. Les premiers essais avec 100 mg de CNT dispersés dans 75 mL de HNO_3 et 25 mL de H_2SO_4 (3 :1 v/v) ont été concluants. Le temps de chauffage a été optimisé selon le type de CNT afin d'obtenir un taux de groupements acides distinctement plus élevé que pour les CNT bruts : vérification par TDS, mesures du pI et enfin par XPS.

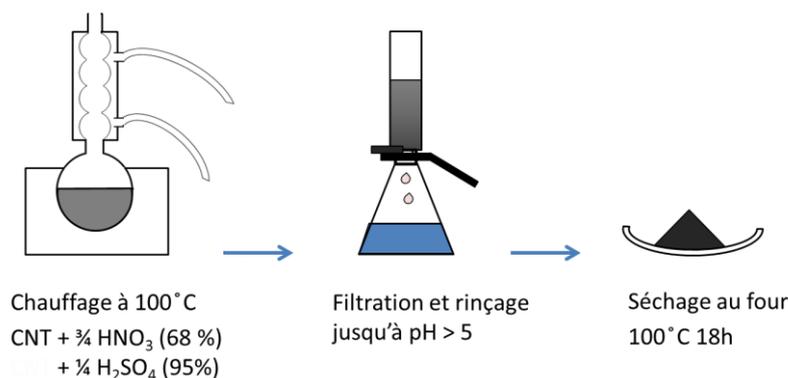


Figure 31 : Protocole de fonctionnalisation acide de nanotubes de carbone (CNT).

Afin de vérifier si la taille des CNT influençait l'impact de la fonctionnalisation acide sur la toxicité, deux types de CNT aux caractéristiques très différentes ont été étudiés. Les premiers

essais de fonctionnalisation ont été réalisés sur des petits MWCNT (Nanocyl NC 7000) présentant un diamètre moyen de 9.5 nm et une longueur moyenne de 1.5 μm d'après les producteurs. 6 h de traitement à l'acide ont été suffisantes pour obtenir un taux de groupements acides largement supérieur à celui des petits CNT bruts (taux d'oxygène de 13% par rapport à 2%). Dans un second temps, des MWCNT recuits à haute température et de dimensions plus importantes ont été fonctionnalisés : 40-80 nm de diamètre moyen et 2-20 μm de longueur moyenne d'après les producteurs (Nano Carbon Technologies Co.). Un prétraitement de 9 h aux ultrasons et une durée de 24 h de chauffage avec la solution d'acides ont été nécessaires afin de fonctionnaliser ces gros MWCNT présentant peu de défauts de structure.

La fonctionnalisation acide a comme principaux effets de greffer des groupements acides en surface et de purifier les CNT des impuretés catalytiques métalliques (voir Chapitre 1, III.3.4.). Une partie des CNT fonctionnalisés ont subi une désorption des groupements acides par traitement thermique sous vide, grâce à l'appareil de TDS. Cela permet de ne pas modifier les autres paramètres physico-chimiques, et ainsi d'obtenir une étude comparative monofactorielle.

L'analyse des modifications physico-chimiques dues à la fonctionnalisation acide et à la désorption subséquente, ainsi que l'analyse de la réponse cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 lors de contacts avec ces divers types de CNT bruts et fonctionnalisés, sont présentées dans l'article suivant publié dans la revue *Journal of Nanoparticle Research*. Les trois principales réponses cellulaires induites par les CNT ont été analysées en dosant pour chacune un paramètre (voir Annexe A1. Méthode) :

- Stress oxydant : dosage des ROS
- Réponse pro-inflammatoire : dosage du TNF- α
- Cytotoxicité : dosage de la LDH relarguée.

Ce choix de paramètres biologiques permet d'avoir une bonne indication de ces réponses cellulaires. Toutefois, cela reste une indication, et l'étude d'autres paramètres complèteraient dans l'idéal ces informations en apportant des précisions sur les voies activées. Ainsi, le TNF- α est une des cytokines les plus produites quantitativement par les macrophages, toutefois sa production n'est pas forcément déclenchée par les mêmes voies d'activation que pour d'autres cytokines ou interleukines. De plus, le relargage de LDH dans le milieu extracellulaire nous renseigne sur la perte d'intégrité membranaire, liée à la nécrose, mais informe peu sur l'apoptose. Afin de simplifier la lecture, nous avons cependant choisi de conserver les termes généraux : stress oxydant, réponse pro-inflammatoire et cytotoxicité, en gardant en tête que cela reste une terminologie généraliste par rapport aux paramètres restreints étudiés.

II. Publication 1

II.1. Article paru dans Journal of Nanoparticle Research

Biological response to purification and acid functionalization of carbon nanotubes

Agathe Figarol · Jérémie Pourchez · Delphine Boudard ·
Valérie Forest · Jean-Marc Tulliani · Jean-Pierre Lecompte ·
Michèle Cottier · Didier Bernache-Assollant · Philippe Grosseau

Received: 22 January 2014 / Accepted: 6 June 2014 / Published online: 26 June 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Acid functionalization has been considered as an easy way to enhance the dispersion and biodegradation of carbon nanotubes (CNT). However, inconsistencies between toxicity studies of acid functionalized CNT remain unexplained. This could be due to a joint effect of the main physicochemical modifications resulting from an acid functionalization: addition of surface acid groups and purification from catalytic metallic impurities. In this study, the impact on CNT biotoxicity of these two physicochemical features was assessed separately. The *in vitro* biological response

of RAW 264.7 macrophages was evaluated after exposure to 15–240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of two types of multi-walled CNT. For each type of CNT (small: 20 nm diameter, and big: 90 nm diameter), three different surface chemical properties were studied (total of six CNT samples): pristine, acid functionalized and desorbed. Desorbed CNT were purified by the acid functionalization but presented a very low amount of surface acid groups due to a thermal treatment under vacuum. A Janus effect of acid functionalization with two opposite impacts is highlighted. The CNT purification decreased the overall toxicity, while the surface acid groups intensified it when present at a specific threshold. These acid groups especially amplified the pro-inflammatory response. The threshold mechanism

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11051-014-2507-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Figarol · P. Grosseau
Ecole Nationale Supérieure des Mines, SPIN-EMSE,
CNRS: UMR 5307, LGF, 158, Cours Fauriel,
42023 Saint-Etienne, France

A. Figarol (✉) · J. Pourchez (✉) · V. Forest ·
D. Bernache-Assollant
Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, EA
4624, SFR IFRESIS, LINA, 158, Cours Fauriel,
42023 Saint-Etienne, France
e-mail: figarol@emse.fr

J. Pourchez
e-mail: pourchez@emse.fr

D. Boudard · M. Cottier
Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, EA 4624, SFR
IFRESIS, LINA, Université Jean Monnet Saint-Etienne,
15, rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne, France

D. Boudard · M. Cottier
CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne, France

J.-M. Tulliani
Department of Applied Science and Technology,
Politecnico di Torino, 10129 Turin, Italy

J.-P. Lecompte
SPCTS, Centre Européen de la Céramique, CNRS: UMR
7315, 12 rue Atlantis, 87068 Limoges, France

which seemed to regulate the impact of acid groups should be further studied to determine its value and potential link to the other physicochemical state of the CNT. The results suggest that, for a safer-design approach, the benefit-risk balance of an acid functionalization has to be considered, depending on the CNT primary state of purification. Further research should be conducted in this direction.

Keywords Carbon nanotubes · Health effects · Nanotoxicity · Surface functionalization · Oxidative stress · Inflammation · Cytotoxicity

Introduction

Over the past few years, the exceptional properties of carbon nanotubes (CNT) have aroused a huge interest in industrial fields as diverse as material science, microelectronics or biomedicine. High mechanical resistance, adsorption capacity, thermal and electric conductivity for example allow the development of numerous applications (Baughman et al. 2002; De Volder et al. 2013). CNT can easily be functionalized with components of interest, and this opens a wide range of possibilities, especially in the biological sector (medical imaging carriers or drug delivery; Bianco et al. 2005; Singh et al. 2012). Nevertheless, their appearance on the market and their increasing use at the research scale raise health concerns especially regarding their structural similarities with asbestos.

CNT have small aerodynamic diameters, and this gives them the potential to penetrate deeply into the lung and activate pathogenic pathways. In spite of an insufficient understanding of their biological impact, it is now well established that the physicochemical features of CNT influence their pulmonary toxicity (Simon-Deckers et al. 2008; Krug and Wick 2011; Kayat et al. 2011). In particular, their size and entanglement, their metallic impurities and their surface functionalization have been shown to affect the biological response through mechanisms and potential combinative effects that are yet to be determined. Case-by-case studies to assess each CNT toxicological feature are a dead-end time- and money-consuming strategy (Choi et al. 2009). It is therefore crucial to gain understanding of the physicochemical characteristics that can impact the biological responses in order to progress toward a safer by design approach (Schrurs and Lison 2012).

Functionalizing CNT surfaces by introducing changes in surface chemical properties has been proposed as a way to reduce CNT toxicity. Acid functionalization is one of the major approaches to this purpose and is of great interest for industrial and research applications (Musso et al. 2009; Ahmadzadeh Tofighy and Mohammadi 2012; Huang et al. 2013). The decrease of CNT hydrophobicity through the newly linked surface acid groups allows a better dispersion in aqueous environment. In addition, acid attack during the functionalization process purifies the CNT from the catalytic impurities resulting from the production process (Jain et al. 2011; Dong et al. 2012). Several studies have moreover featured acid functionalization processes that enhance the CNT biodegradation and biocompatibility (Kagan et al. 2010; Liu et al. 2010; Bianco et al. 2011).

Despite ample research, the comprehensive impact of acid functionalization on the *in vitro* cellular response remains unclear. Some studies have even shown that acid functionalized CNT are more toxic than pristine ones (Gutiérrez-Praena et al. 2011; Dong et al. 2012). Results are conflicting even when selecting *in vitro* studies using the same cell line. Studies on murine macrophages (RAW 264.7) reported increased cytotoxicity and inflammation through the cellular internalization of acid functionalized single-walled (SWCNTf) or multi-walled CNT (MWCNTf; Dong et al. 2012; Wang et al. 2012). Another study showed that MWCNTf induced a reduced cytotoxicity but a slight increase of inflammation and oxidative stress (Zhang et al. 2012). Lastly, based on Fraczek-Szczypta et al. work (2012), the cytotoxicity of MWCNTf remains globally unchanged compared to pristine MWCNT while they have a tendency to decrease cell proliferation.

The aim of this study was to investigate the impact of acid functionalization independently of any other parameter. It was hypothesized that part of the inconsistencies between previous studies was due to an overlap of the two main impacts of an acid functionalization on the CNT structures: addition of surface acid groups and purification by removal of catalytic impurities. To avoid a multifactorial analysis as far as possible, an original desorption process was conducted. Part of the acid functionalized CNT was treated thermally to reduce the amount of surface acid groups leaving all other physicochemical parameters unaffected. As a result of this, it was possible to compare the following:

1. desorbed and pristine CNT, to assess the impact of the purification from catalytic impurities,
2. desorbed and functionalized CNT, to evaluate the biological impact of surface acid groups.

Experimental procedures

Carbon nanotube treatments

Two types of MWCNT were used: small and non-purified MWCNT (pristine: sCNT, functionalized: sCNTf, and desorbed: sCNTd) versus bigger ones previously annealed at 2,600 °C thus with few impurities and structural defects (pristine: bCNT, functionalized: bCNTf and desorbed: bCNTd). An extended physicochemical characterization was conducted according to the ISO recommendation (ISO—International Organization for Standardization 2012). sCNT (NC7000, Nanocyl, Sambreville, Belgium) and bCNT (Nano Carbon Technologies Co., Tokyo, Japan) have diameters of 9.5 nm and 40–80 nm, respectively, according to the manufacturers, and lengths of 1.5 and 2–20 μm (from 250 measurements by optical microscopy). The annealing treatment undergone by the big CNT has reduced the level of catalytic impurities and structural defaults. A preliminary ultrasonic treatment was thus applied to the pristine bCNT to create reactive sites. Acid functionalization has been conducted after the optimization of a well-documented protocol (Ang et al. 2000; Rosca et al. 2005; Jain et al. 2011; Chen et al. 2012).

Preliminary treatment of pristine big CNT: 30 % intensity was applied using a microprobe on a 100 mg bCNT/10 mL MQ water (Synergy 185, Millipore) suspension during 9 h (30 %, 3 mm probe, Branson Sonifier S-450D).

Acid functionalization: following oxidation by refluxing in a solution of nitric and sulfuric acids (3:1 v/v, 6 h for sCNT, 24 h for bCNT), functionalized CNT were filtered (0.025 μm MF-Millipore Membrane) and rinsed until the pH reached five. The obtained functionalized CNT were dried into an oven at 100 °C for 18 h.

Desorption: A thermal treatment to desorb surface acid groups was applied on half of the functionalized CNT using a vacuum furnace. The sample was heated

at 20 °C min^{-1} until 850 °C, then let cooled down to ambient temperature.

Physicochemical characterization

Morphology and diameter were analyzed using field-emission scanning electron microscopy (FEG-SEM, model Supra 55 VP, Zeiss) at a 2 kV. Samples were prepared by the deposition of a small quantity of CNT powder on a carbon-coated holey film and coated with a 3 nm gold layer. Diameters were expressed as the average value of 100 measurements. The same procedure was repeated thrice using ImageJ software. Structural defects were studied using Raman spectroscopy (XploRA, Horiba Scientific, laser at 532 nm). For each CNT type, a spectrum was realized between 1,000 and 2,000 cm^{-1} using a network at 2,400 T. The specific surface areas (SSA, $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) were determined by N_2 adsorption at 77 K after out-gassing for 4 h at 110 °C (Micromeritics ASAP 2000) using the Brunauer–Emmet–Teller (BET) method. The amount of metallic catalytic impurities was assessed by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES).

Identification of the acid groups resulting from the functionalization was undergone by means of thermal desorption spectroscopy (TDS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). For TDS, 10 mg of CNT powder were heated under vacuum at a heating rate of 20 °C min^{-1} until 850 °C. Two turbomolecular pumps ensure a vacuum $<10^{-2}$ Pa. A mass spectrometer (Balzers QMG 112 quadrupole) collected and analyzed the volatilized elements. XPS was used to determine the oxygen atomic percentage (with 20 % incertitude Thermo VG Thetaprobe, monochromatized Al K source, 400 μm width analyzed, 1.3×10^{-7} Pa of residual pressure). Samples were prepared by the sonication of a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CNT suspension in ethanol (5 min, 30 %, 3 mm probe). One drop was deposited and dried on a 1- cm^2 silicon wafer previously covered by a 5-nm gold layer to avoid O contribution from the substrate. The spectra were corrected for Shirley-type backgrounds. Automatic search of the peak positions were conducted from the fixed C1s peak at 284.5 eV. Atomic percentages were calculated from the peak areas and given sensitivity factors. Zeta potentials were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CNT suspensions in MQ

water prepared by sonication (5–15 min, 30 %, 3 mm probe, Branson Sonifier).

In vitro toxicity assessment

Typical concentrations of 30, 60, and 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were used for the toxicity assays. Moreover, a 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration were also investigated, respectively, for the big and small CNT, to obtain a comparable dose in surface. The highest concentrations of CNT were dispersed in culture medium: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) complemented with 10 % of fetal calf serum (FCS, Invitrogen), 1 % penicillin–streptomycin (penicillin 10,000 U mL^{-1} , streptomycin 10 mg mL^{-1} , Sigma-Aldrich). A sonication was carried out until the complete dispersion of the suspension (5–30 min, 30 %, 3 mm probe, Branson Sonifier S-450D). The dispersion and suspension stability were established by measuring zeta potential and particle size distribution by means of the light scattering technique (Zetasizer Nano ZS, see IX). After dilutions, the suspensions were kept at 4 °C and used in the following 48 h. Toxicity assays were carried out on a RAW 264.7 cell line, provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem LGC) and derived from mice peritoneal macrophages transformed by the AMLV (Alberson murine leukemia virus). Cells were cultured in complemented DMEM and incubated at 37 °C under a 5 % carbon dioxide humidified atmosphere.

Oxidative stress

Acute oxidative stress was estimated by measuring the intracellular reactive oxygen species (ROS) level using the OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs). Cells were allowed to adhere for 4 h in a black 96-well plate (seeded at 2×10^6 cells/well). A 1 h pre-treatment with the cell-permeant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) was carried out before a short 90-min incubation with the CNT. The fluorescence intensities were read at 480 nm excitation and 530 nm emission (Fluoroskan Ascent, Thermo scientific). The results were then corrected for bias thanks to acellular standard curves: Experiments were carried out to measure the variations between the fluorescence obtained for 0, 10, 100, 1,000 nM standard curve of the fluorescent probe DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) in complemented

medium with and without CNT. Corrections were calculated for each CNT type and each dose (Online Resource Figure S5 and Table S1).

Pro-inflammatory response

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production represents the appropriate cytokine indicator of the pro-inflammatory response for macrophage cells. After 24-h incubation with CNT in a 96-well plate (seeded at 100,000 cells/well), TNF- α release was assessed using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Quantikine® Mouse TNF- α /TNFSF1A Immunoassay, R&D systems). The optical density was determined according to the manufacturer's instructions, using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific) at 450 nm. A standard curve was established and results were expressed in pg mL^{-1} of TNF- α .

Cytotoxicity

Cell viability was evaluated by quantifying lactate dehydrogenase (LDH) released in culture supernatant from cells with damaged membranes. After 24-h incubation with CNT in a 96-well plate (seeded at 100,000 cells/well), the CytoTox-96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega) was used according to the manufacturer's instructions. Detection was performed using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific) at 450 nm. The activity of the released LDH was reported as a percentage of the total cellular LDH (measured after the complete lysis of control cells).

Statistical analysis

Results were expressed as the average of three independent experiments each carried out in triplicates, with standard errors of the mean value. Statistical significance was declared when $p < 0.05$ using a Student's test (Rakotomalala 2005).

Results

Physicochemical characterization of carbon nanotubes

Small and big CNT exhibited very different morphologies as shown by the FEG-SEM in Fig. 1. Small CNT

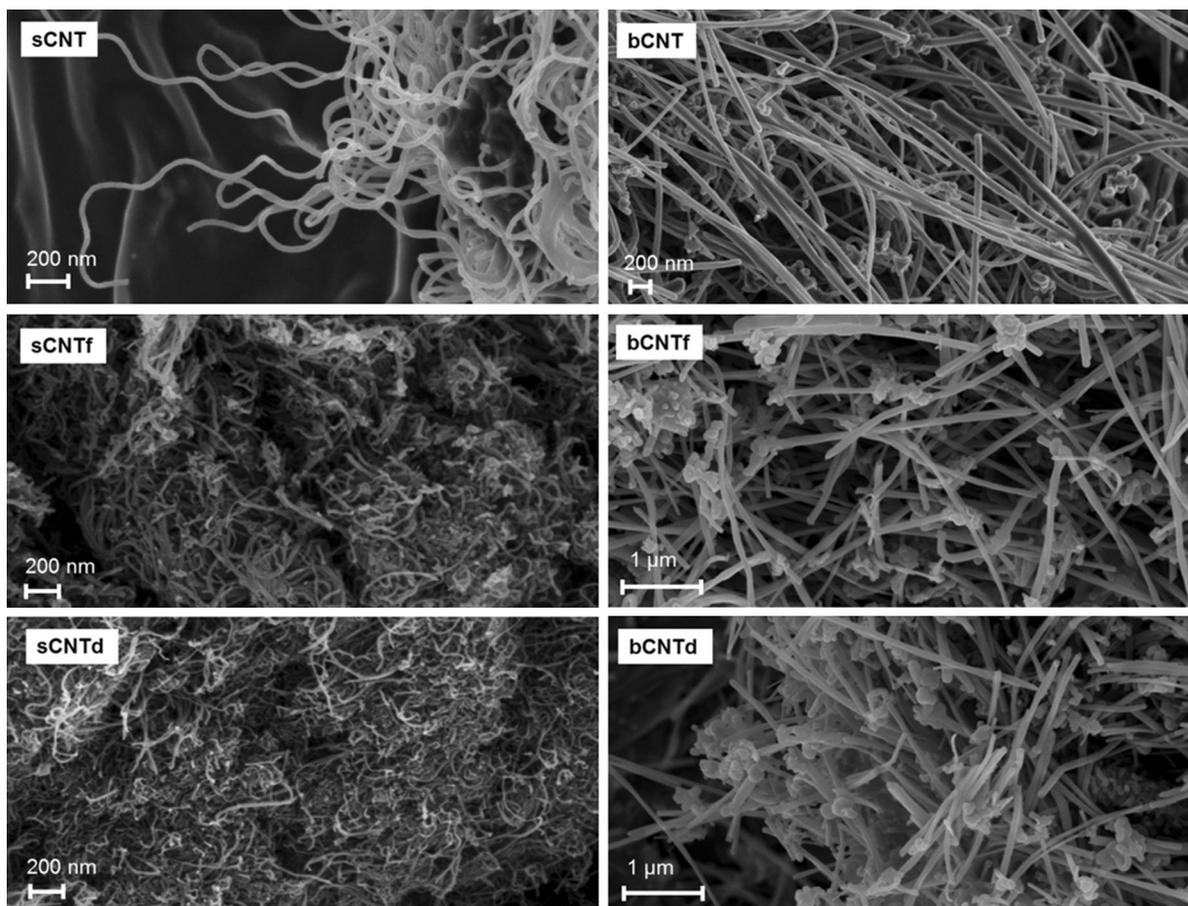
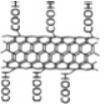
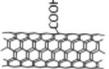
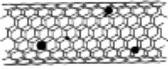
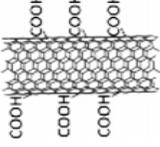
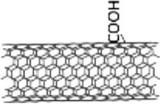


Fig. 1 FEG-SEM images of small carbon nanotubes pristine (sCNT), functionalized (sCNTf), and desorbed by thermal treatment after functionalization (sCNTd), as well as big carbon nanotubes pristine (bCNT), functionalized (bCNTf), and desorbed (bCNTd)

were named after their thin diameters of 9.5 nm according to the manufacturer, 23 ± 4 nm according to FEG-SEM measurements, and short lengths of 1.5 μm according to the manufacturer. Big CNT exhibited larger dimensions with diameters of 40–80 nm according to the manufacturers, 91 ± 29 nm according to FEG-SEM measurements, and were longer with lengths reaching 2–20 μm according to optical microscopy measurements. Small CNT appeared thin and curved, while big CNT were thick and straight due to their few amount of structural defects. As proposed by Lu et al. (1996), bCNT first underwent an optimized 9-h ultrasonic treatment to create reactive sites for the acid functionalization with no significant effect on their diameter. After functionalization, a slight increase in carbonaceous debris was observed for both CNT types. Physicochemical

features are presented in Table 1. Acid attack of the first graphene walls reduced the diameters by up to 7 nm for the small CNT and 15 nm for the big CNT. The entanglement of the tubes did unfortunately not allow to confirm the declared length for small CNT by FEG-SEM observations. No difference in length was detected by optical microscopy for big CNT after functionalization and desorption, but the technique remained imprecise. Likewise, the degree of structural defects rose for both CNT types after functionalization as revealed by the intensity of the D- to G-band ratio from the Raman spectra (Online Resource Figure S1 and Figure S2). The diameters and the degree of structural defects remained close after thermal desorption of the surface acid groups. Specific surface areas were decreased of around 10 % after functionalization according to the B.E.T. data.

Table 1 Physicochemical characteristics of the six carbon nanotubes

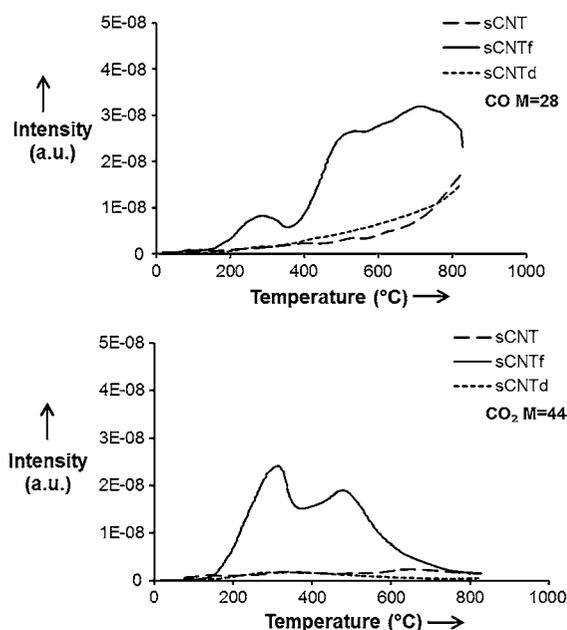
Sample	sCNT	sCNTf	sCNTd	sCNT	bCNTf	bCNTd
Diameter (nm)	23 ± 4	16 ± 5	15 ± 4	91 ± 29	76 ± 21	81 ± 21
Structural disorder (1d/1g)	0.82	1.83	1.76	0.24	0.35	0.35
SSA (m ² g ⁻¹)	317 ± 2	279 ± 1	335 ± 2	21.5 ± 0.1	19.0 ± 0.4	22.1 ± 0.4
Catalytic impurities (wt%)	Fe 0.15 Al 4.83 Co 0.13	Fe 0.05 Al 0.03 Co 0.02	Not tested	Fe 0.51 Al 0.01 Co 0.00	Fe 0.01 Al 0.01 Co 0.00	Not tested
O (atomic %)	2	13	-	3	14	5
Zeta potential (mV)	-9 ± 8	-48 ± 2	-19 ± 2	-23 ± 12	-41 ± 7	-1.29 ± 13
Isoelectric point (pH)	4.25 ± 0.86	<1.5	3.51 ± 0.13	3.00 ± 0.07	1.79 ± 0.13	4.01 ± 0.30
Representation (Melchor and Dobado 2004)						

SSA, specific surface area; -, the measure could not be determined.

ICP-AES evidenced high amounts of catalytic impurities for sCNT (4.8 wt% Al and more than 0.1 wt% Fe and Co) which fell under 0.05 wt% after acid functionalization. Annealed bCNT contained only 0.5 wt% Fe and 0.01 wt% after functionalization.

Thermal desorption spectroscopy gave qualitative measurements of CO and CO₂ during heating under vacuum of CNT. While sCNT and sCNTd exhibited very similar spectra with almost no gas desorption, two main peaks of sCNTf were identified as resulting from the desorption of CO and CO₂ from the acid groups (Fig. 2). It is consistent with Boehm (2002) which studied the desorption of surface groups from acid functionalization and stated that desorbed CO₂ are generally assumed to derive from carboxyl groups and CO from hydroxyl and ether-type oxygen. Big CNT showed similar trends with lower intensities of CO and CO₂ peaks (Online Resource Figure S3). As expected, because of the high-temperature treatment which decreased microstructural defects, bCNT and bCNTd are more stable in temperature with respect to sCNT and sCNTd (Fig. 2).

First, general XPS spectra were analyzed for the six samples. Three main peaks were identified: the C1s peak at 284.5 eV, the O1s peak at 533 eV, and the

**Fig. 2** Thermal desorption of the small CNT, CO, and CO₂ release. sCNT small carbon nanotubes pristine, sCNTf functionalized, sCNTd desorbed

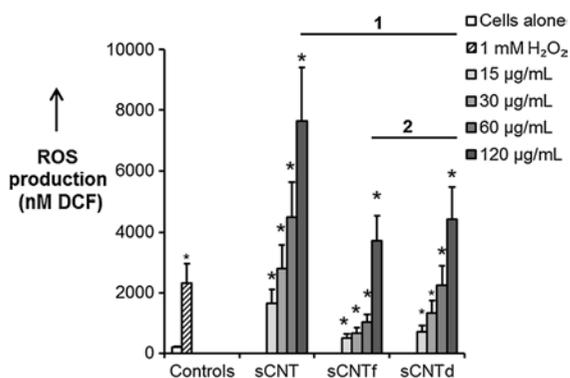


Fig. 3 Impact of the purification (1) and absence of impact of surface acid groups (2) of the small CNT on the oxidative stress determined by ROS production after a 90-min exposure ($n = 3$, $*p < 0.05$). Results are expressed in nM of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) after correction for CNT absorption. *sCNT* small carbon nanotubes pristine, *sCNTf* functionalized, *sCNTd* desorbed

Au4f peaks from the substrate at 84 and 87.5 eV. The absence of contribution from the SiO₂ substrate (no signal from the Si2p peak) and from the air contamination were verified. A more detailed spectrum was realized for each of the four peaks. Oxygen atomic percentage rose after functionalization but came back close to the pristine ones for the desorbed bCNTd.

Charged surface acid groups linked by CNT functionalization can be assessed by the measurement of the zeta potential (ζ) and of the isoelectric point (pI). ζ in water decreased from -9 to -48 mV for sCNT and sCNTf, and from -23 to -41 mV for bCNT and bCNTf, respectively. pI of functionalized CNT were lower than 1.8, but have been detected over 3.0 for pristine and desorbed CNT.

In vitro cellular responses

The biological activity of the six CNT was assessed using a murine macrophage cell line (RAW 264.7). Microscopic observations revealed interactions between CNT and cells with phagocytosis of small CNT (Online Resource Figure S4). Three different cellular and molecular parameters were evaluated: LDH release, assessing cell membrane integrity and thus the cytotoxicity, TNF- α production, indicating the pro-inflammatory response, and intracellular ROS production, directly related to oxidative stress. The cells were incubated with three doses of CNT within the range of in vitro concentrations commonly used

(30, 60, 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ or 7.5–30 $\mu\text{g cm}^{-2}$; Fraczek-Szczypta et al. 2012; Dong et al. 2012; Wang et al. 2012; Zhang et al. 2012). These concentrations correspond to those of Vietti et al. (2013) study, even though they stated that relevant concentrations regarding the first occupational exposures studies stand around 0.025–0.2 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ to simulate a 2 months exposure. But because lung deposition is irregular in vivo and because in vitro studies are looking at acute toxicity with a maximum of 24-h exposure, while not 100 % CNT will deposit on the cells, they considered the used concentration range as pertinent. Moreover, as big CNT have a 15 times smaller specific area, a 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentrations were added, respectively, for the big and small CNT for a comparable dose in surface.

Oxidative stress

ROS production was evaluated by a fluorimetric method which was strongly biased by the presence of CNT in the culture supernatant as it has been demonstrated for techniques for other toxicological outcomes such as MTT assay (Wörle-Knirsch et al. 2006; Casey et al. 2007; Belyanskaya et al. 2007; Shvedova et al. 2009). Corrections based on acellular standard curves were applied (see Online Resource Figure S5 and Table S1). At high doses of sCNT ROS levels were, respectively, twice and more than thrice higher than for the positive control (cells incubated with 1 mM of H₂O₂, Fig. 3). However, after functionalization and desorption, the levels were reduced to just half of the initial values. No significant change was observed between sCNTf and sCNTd. Values for big CNT were not significantly different from the negative control (data not shown).

Pro-inflammatory response

TNF- α production was enhanced in a dose-dependent way by any dose of sCNTf but only by high doses of sCNT (Fig. 4). Conversely, sCNTd induced no significant response. Any dose of bCNT significantly induced TNF- α production in a dose-dependent manner (Fig. 5). bCNTd showed no significant TNF- α production except at the highest concentration, showing a crucial reduction of the pro-inflammatory response for concentrations under 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

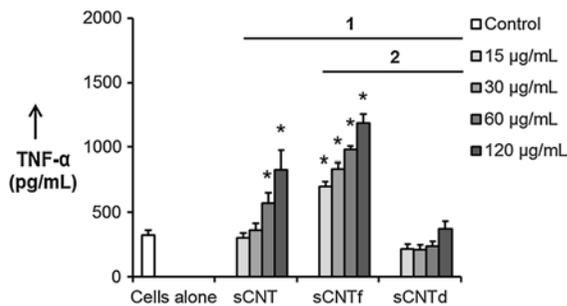


Fig. 4 Impact of the purification (*I*) and of surface acid groups (*2*) of the small CNT on the pro-inflammatory response determined by TNF- α production after a 24-h exposure ($n = 3$, $*p < 0.05$). *sCNT* small carbon nanotubes pristine, *sCNTf* functionalized, *sCNTd* desorbed

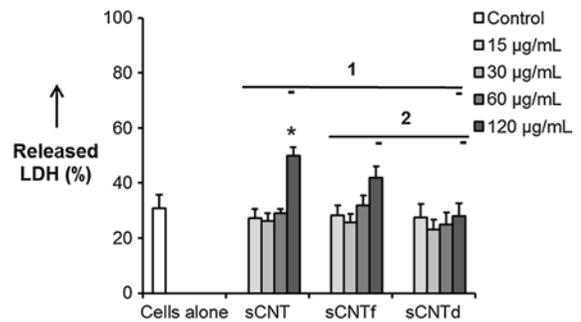


Fig. 6 Impact of the purification (*I*) and of surface acid groups (*2*) of small CNT on the cytotoxicity determined by LDH release after a 24-h exposure reported to that of total cellular LDH measured after the lysis of negative control cells ($n = 3$, $*p < 0.05$). *sCNT* small carbon nanotubes pristine, *sCNTf* functionalized, *sCNTd* desorbed

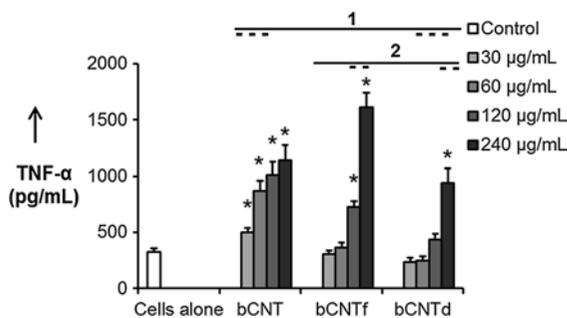


Fig. 5 Impact of the purification (*I*) and of surface acid groups (*2*) of the big CNT on the pro-inflammatory response determined by TNF- α production after a 24-h exposure ($n = 3$, $*p < 0.05$). *bCNT* big carbon nanotubes pristine, *bCNTf* functionalized, *bCNTd* desorbed

bCNTf induced a significant response from $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ at significantly higher levels than bCNTd.

Cytotoxicity

Cytotoxicity was only significant at the highest dose of sCNT with 50 % released LDH (Fig. 6). After functionalization and following desorption, no significant cytotoxicity was observed. Nevertheless, at the highest dose of sCNTd, LDH level tended to a lower value compared to sCNTf. No significant LDH release was observed after incubation of the cells with bCNT (Fig. 7). However, after functionalization and following desorption, LDH release increased significantly reaching around 60 % for bCNTd.

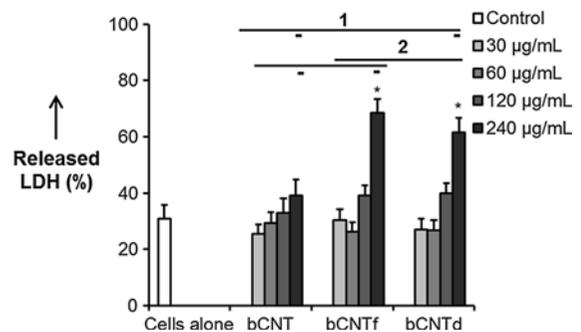


Fig. 7 Impact of acid functionalization of big CNT on the cytotoxicity determined by LDH release after a 24-h exposure reported to that of total cellular LDH measured after the lysis of negative control cells ($n = 3$, $*p < 0.05$, *1* potential impact of the purification and *2* of the surface acid groups). *bCNT* big carbon nanotubes pristine, *bCNTf* functionalized, *bCNTd* desorbed

Discussion

Physicochemical characterization

The two CNT types, small or big, exhibited very dissimilar features in size, in specific surface area, and in the amount of structural defects and catalytic impurities due to the annealing treatment of bCNT (Kim et al. 2005; Musso et al. 2009). However, the aim of this study was not to focus on the comparison between big and small CNT but to highlight shared trends in the biological impact of acid functionalization and to discriminate the influence of surface acid groups from that of the purification from catalytic impurities (see summary in Table 2). Even though a

Table 2 Summary of the impact of CNT acid functionalization on the biological response

	Oxidative stress	Pro-inflammatory response	Cytotoxicity
Purification			
sCNT ↔ sCNTd	↘	↘	↘
bCNT ↔ bCNTd	→	↘	Observed ↗ but supposed ↘
Surface acid groups			
sCNTd ↔ sCNTf	→	↗	→
bCNTd ↔ bCNTf	→	↗ if >t ^a	Observed → but supposed ↗ if >t ^a

↗: Increase, →: no significant change, or ↘: decrease after purification or addition of surface acid groups

^a Threshold of surface acid groups dependent of CNT types

complete exclusion of the other parameters cannot be guaranteed, when comparing pristine and functionalized CNT, as CNT physicochemical assessment led to conclude that surface acid groups and metallic impurities are the main parameters altered by an acid functionalization. Aside from the purification and the functionalized groups, the acid treatment modified the CNT structure by decreasing their diameters and by increasing their structural defects. As Hu et al. (2003) observed in their work, thinning down CNT diameters and increase in debris were observed on SEM pictures for both CNT types after functionalization. Raman Id/Ig ratio confirmed the formation of structural defects after functionalization, at very low levels for big CNT due to the annealing treatment. These outcomes remained unchanged after desorption of the surface acid groups; thus, the comparison between functionalized and desorbed CNT was not influenced by these parameters, but they have to be kept in mind when comparing pristine and desorbed ones. SSA remained at comparable levels after acid treatment following by desorption. The 10 % decrease observed directly after functionalization may be due to the steric effect of the acid groups, while the minor increase after desorption may be due to the reduction of aggregate amount (Petersen and Henry 2012).

The presence of surface acid groups resulting from acid functionalization was confirmed by TDS, by XPS, and by the decrease of *pI* determined from zeta potential measurements. Moreover, the “defunctionalization” was validated by thermal desorption techniques as a method to eliminate most of the surface acid groups. The difficulty to functionalize the annealed big CNT with few structural defects was evidenced by a lower amount of surface acid groups and by lower TDS peak intensities. It can also be

explained by the large diameter of the bCNT and weak reactivity of its surface. Indeed, C sp² constituting CNT are forced to maintain a deformed orbital geometry due to the curvature of the tube. This phenomenon is called pyramidalization. The lower the curvature is (i.e., the higher diameter is), the lower the pyramidalization angle and the reactivity of CNT are (Chen et al. 2003). Atomic concentrations obtained from XPS measurements are semi-quantitative and confirmed the qualitative TDS measurements. Both techniques, however, indicate that oxidation occurred but cannot specify the nature of the functional groups. Moreover, the presence of surface acid groups enhanced the stability of CNT suspensions in water. Unstable dispersions are characterized by a zeta potential between −30 and +30 mV, and they were found out of this range only for functionalized CNT. However, zeta potentials can vary a lot according to pH and ionic strength. A pH titration was thus realized to determine the isoelectric point, an independent parameter which lastly confirmed that functionalization and desorption processes were completed.

In vitro cellular response

Metal impurities (especially Fe) have been extensively linked with oxidative stress enhancement, due to their involvement in the Fenton reaction (Carter et al. 1997; Pulskamp et al. 2007; Ge et al. 2012). The absence of any significant ROS production for big CNT is thus consistent with their low amount of impurities. Likewise, the critical decline of ROS production of the small CNT after acid functionalization could be imputed to the purification from catalytic impurities, as no significant difference was seen after desorption of the surface acid groups (see summary in Table 2).

Surprisingly they have been little study on the impact of acid functionalization on oxidative stress. The results of this study are consistent with those of Jain et al. (2011) which found in vivo a decrease in oxidative stress after acid functionalization which was not linked to the degree of functionalization. To our knowledge, only one other study examined the impact of a thermal treatment (600 °C 4 h under N₂) after acid functionalization. Zhang et al. work (2011) concluded that functionalized MWCNT induced more oxidative stress on HeLa cells compared to the thermally treated ones. No comparison was done with pristine CNT, and no further discussion was made about the potential role of surface acid groups. Moreover, a different cell line has been used (human cervix adenocarcinoma) which could explain the difference in toxicity mechanism.

The purification of catalytic impurities is also thought to be involved in the decrease of the pro-inflammatory response. Surface acid groups seemed to trigger the TNF- α production when present in a concentration higher to a threshold determined by the CNT type (bCNTf increased TNF- α production only at the highest concentrations). The opposite impacts of purification and of surface acid groups were underlined. They allow a better understanding of the conflicting results of the literature regarding the pro-inflammatory response, as enhancement (Dong et al. 2012; Wang et al. 2012) and decrease (Jain et al. 2011) due to acid functionalization have both been observed. Zhang et al. (2011) did not assess the production of pro-inflammatory factors with their functionalized or thermally treated CNT, so this study cannot confirm our theory.

Regarding cytotoxicity, the same mechanism of decrease in toxicity by the removal of catalytic impurities is believed to occur. No significant LDH releases were observed after functionalization of the small CNT with or without high level of surface acid groups. At 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sCNTf exhibited what could be a slight echo from the increase in the pro-inflammatory response, but the LDH release remained non-significant. A contradictory trend appeared to exist for big CNT. bCNT was not cytotoxic while bCNTf and bCNTd at 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ induced LDH release which were not significantly different from one another. This suggested that purification but not surface acid groups were associated with an increase in cytotoxicity. However, according to our results, it is rather believed that the impact of purification was not

detectable due to the low amount of impurities. The significant increase in LDH release observed after functionalization could be attributed to the surface acid groups with a threshold-dependent mechanism explaining why LDH release remained significant after the desorption of part of the surface acid groups. For Zhang et al. (2011) after a thermal treatment removing the surface acid groups, the induced cytotoxicity was found lower than for just functionalized CNT. They suggested that surface acid groups do have an influence on cytotoxicity. Our hypothesis involving a threshold mechanism dependent on the CNT structure could explain the inconsistency in previous works. For several studies, acid functionalization tended to increase the cytotoxicity (Bottini et al. 2006; Dong et al. 2012; Wang et al. 2012; Fröhlich et al. 2012), while for others, it had no impact (Fraczek-Szczypta et al. 2012) or conversely decreased the cytotoxicity (Zhang et al. 2012; Lorena Montes-Fonseca et al. 2012).

The increased effect on TNF production and cytotoxicity of functionalized CNT with surface acid groups could be due to an increase of the bioactivity or higher reactivity of the functionalized surface. However, this could also be explained by the increased dispersibility of the CNT in the aqueous culture medium even though an optimized sonication tended to lower the difference. Cells could be exposed to a greater number of CNT structures with higher available surface area, which has been reported to enhance biological impacts (Wang et al. 2010). TNF- α and LDH results were also examined with doses expressed in surface calculated from the CNT specific surface area (Online Resource Figure S6 and Figure S7). Whatever the surface chemical property, the pro-inflammatory response and cytotoxicity after contact with the big CNT were globally higher than those triggered by the small CNT for equivalent mass or surface doses. This could be due to “frustrated phagocytosis” generated by these long and straight CNT (Brown et al. 2007; Tran et al. 2011; Gustavsson et al. 2012). Indeed, it has been reported that macrophages fail to fully engulf oversized CNT and try constantly to break them down instead. This “frustrated phagocytosis” has been shown to trigger inflammation, in addition to oxidative stress, genotoxicity, and apoptosis.

Furthermore the conclusions suggested in this study are based on in vitro tests. It is acknowledged that cell

culture studies do not always reflect in vivo responses and by extension real-life exposure consequences. However, such studies can help identifying the basic mechanisms of the CNT biological reactivity and help industrials to understand these trends to design safer nanomaterials.

Conclusion

In conclusion, the two main physicochemical effects of the acid functionalization of CNT can induce a Janus impact on in vitro cellular response. The CNT purification appeared to decrease the induction of oxidative stress, pro-inflammatory response, and cytotoxicity. Conversely, the surface acid groups seemed to increase the pro-inflammatory response and the cytotoxicity if exceeding a threshold dependent on the CNT type. Therefore, acid functionalization could increase the toxicity of CNT depending on their degree of catalytic impurities and of a threshold. This mechanism should be further investigated. The benefit–risk balance of an acid functionalization should be considered for future applications of CNT under a safer by design approach.

Acknowledgments The authors would like to acknowledge the financial support of Saint-Etienne Métropole and the Conseil Général de la Loire. The authors would like to thank Yoann Garnier and Vincent Barnier from the structure and material center (EMSE) for their help regarding the XPS measurements.

References

- Ahmadzadeh Tofighy M, Mohammadi T (2012) Nitrate removal from water using functionalized carbon nanotube sheets. *Chem Eng Res Des* 90:1815–1822. doi:[10.1016/j.cherd.2012.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cherd.2012.04.001)
- Ang LM, Hor TSA, Xu GQ et al (2000) Decoration of activated carbon nanotubes with copper and nickel. *Carbon* 38:363–372. doi:[10.1016/S0008-6223\(99\)00112-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6223(99)00112-8)
- Baughman RH, Zakhidov AA, de Heer WA (2002) Carbon nanotubes—the route toward applications. *Science* 297:787–792. doi:[10.1126/science.1060928](https://doi.org/10.1126/science.1060928)
- Belyanskaya L, Manser P, Spohn P et al (2007) The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction. *Carbon* 45:2643–2648. doi:[10.1016/j.carbon.2007.08.010](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.08.010)
- Bianco A, Kostarelos K, Prato M (2005) Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol* 9:674–679. doi:[10.1016/j.cbpa.2005.10.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.005)
- Bianco A, Kostarelos K, Prato M (2011) Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chem Commun* 47:10182–10188. doi:[10.1039/c1cc13011k](https://doi.org/10.1039/c1cc13011k)
- Boehm HP (2002) Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. *Carbon* 40:145–149. doi:[10.1016/S0008-6223\(01\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6223(01)00165-8)
- Bottini M, Bruckner S, Nika K et al (2006) Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett* 160:121–126. doi:[10.1016/j.toxlet.2005.06.020](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.06.020)
- Brown DM, Kinloch IA, Bangert U et al (2007) An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon* 45:1743–1756. doi:[10.1016/j.carbon.2007.05.011](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.05.011)
- Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB (1997) Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol* 146:180–188. doi:[10.1006/taap.1997.8254](https://doi.org/10.1006/taap.1997.8254)
- Casey A, Herzog E, Davoren M et al (2007) Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 45:1425–1432. doi:[10.1016/j.carbon.2007.03.033](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.03.033)
- Chen Z, Thiel W, Hirsch A (2003) Reactivity of the convex and concave surfaces of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) towards addition reactions: dependence on the carbon-atom pyramidalization. *Chemphyschem* 4:93–97. doi:[10.1002/cphc.200390015](https://doi.org/10.1002/cphc.200390015)
- Chen J, Chen Q, Ma Q (2012) Influence of surface functionalization via chemical oxidation on the properties of carbon nanotubes. *J Colloid Interface Sci* 370:32–38. doi:[10.1016/j.jcis.2011.12.073](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.073)
- Choi JY, Ramachandran G, Kandlikar M (2009) The impact of toxicity testing costs on nanomaterial regulation. *Environ Sci Technol* 43:3030–3034. doi:[10.1021/es802388s](https://doi.org/10.1021/es802388s)
- De Volder MFL, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ (2013) Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science* 339:535–539. doi:[10.1126/science.1222453](https://doi.org/10.1126/science.1222453)
- Dong PX, Wan B, Guo LH (2012) In vitro toxicity of acid-functionalized single-walled carbon nanotubes: effects on murine macrophages and gene expression profiling. *Nanotoxicology* 6:288–303. doi:[10.3109/17435390.2011.573101](https://doi.org/10.3109/17435390.2011.573101)
- Fraczek-Szczypta A, Menaszek E, Syeda T et al (2012) Effect of MWCNT surface and chemical modification on in vitro cellular response. *J Nanopart Res* 14:1–14. doi:[10.1007/s11051-012-1181-1](https://doi.org/10.1007/s11051-012-1181-1)
- Fröhlich E, Meindl C, Höfler A et al (2012) Combination of small size and carboxyl functionalisation causes cytotoxicity of short carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 1–14. doi:[10.3109/17435390.2012.729274](https://doi.org/10.3109/17435390.2012.729274)
- Ge C, Li Y, Yin JJ et al (2012) The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. *NPG Asia Mater* 4:e32. doi:[10.1038/am.2012.60](https://doi.org/10.1038/am.2012.60)
- Gustavsson P, Hedmer M, Rissler J (2012) Carbon nanotubes—Exposure, toxicology and protective measures in the work environment. Swedish Work Environment Authority (Arbetsmiljöverket)

- Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Sánchez E et al (2011) Influence of carboxylic acid functionalization on the cytotoxic effects induced by single wall carbon nanotubes on human endothelial cells (HUVEC). *Toxicol In Vitro* 25:1883–1888. doi:[10.1016/j.tiv.2011.05.027](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.027)
- Hu H, Zhao B, Itkis ME, Haddon RC (2003) Nitric acid purification of single-walled carbon nanotubes. *J Phys Chem B* 107:13838–13842. doi:[10.1021/jp035719i](https://doi.org/10.1021/jp035719i)
- Huang J, Ng AL, Piao Y et al (2013) Covalently functionalized double-walled carbon nanotubes combine high sensitivity and selectivity in the electrical detection of small molecules. *J Am Chem Soc* 135:2306–2312. doi:[10.1021/ja310844u](https://doi.org/10.1021/ja310844u)
- ISO—International Organization for Standardization (2012) ISO/TR 13014:2012—Nanotechnologies—Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment
- Jain S, Thakare VS, Das M et al (2011) Toxicity of multiwalled carbon nanotubes with end defects critically depends on their functionalization density. *Chem Res Toxicol* 24:2028–2039. doi:[10.1021/tx2003728](https://doi.org/10.1021/tx2003728)
- Kagan VE, Konduru NV, Feng W et al (2010) Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nanotechnol* 5:354–359. doi:[10.1038/nnano.2010.44](https://doi.org/10.1038/nnano.2010.44)
- Kayat J, Gajbiye V, Tekade RK, Jain NK (2011) Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 7:40–49. doi:[10.1016/j.nano.2010.06.008](https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.06.008)
- Kim YA, Hayashi T, Endo M et al (2005) Synthesis and structural characterization of thin multi-walled carbon nanotubes with a partially faceted cross section by a floating reactant method. *Carbon* 43:2243–2250. doi:[10.1016/j.carbon.2005.03.039](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2005.03.039)
- Krug HF, Wick P (2011) Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew Chem-Int Ed* 50:1260–1278. doi:[10.1002/anie.201001037](https://doi.org/10.1002/anie.201001037)
- Liu X, Hurt RH, Kane AB (2010) Biodurability of single-walled carbon nanotubes depends on surface functionalization. *Carbon* 48:1961–1969. doi:[10.1016/j.carbon.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.02.002)
- Lorena Montes-Fonseca S, Orrantia-Borunda E, Aguilar-Elguezabal A et al (2012) Cytotoxicity of functionalized carbon nanotubes in J774A macrophages. *Nanomedicine-Nanotechnol Biol Med* 8:853–859. doi:[10.1016/j.nano.2011.10.002](https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.10.002)
- Lu KL, Lago RM, Chen YK et al (1996) Mechanical damage of carbon nanotubes by ultrasound. *Carbon* 34:814–816. doi:[10.1016/0008-6223\(96\)89470-X](https://doi.org/10.1016/0008-6223(96)89470-X)
- Melchor S, Dobado JA (2004) CoNTub: an algorithm for connecting two arbitrary carbon nanotubes. *J Chem Inf Comput Sci* 44:1639–1646. doi:[10.1021/ci049857w](https://doi.org/10.1021/ci049857w)
- Musso S, Tulliani J-M, Ferro G, Tagliaferro A (2009) Influence of carbon nanotubes structure on the mechanical behavior of cement composites. *Compos Sci Technol* 69:1985–1990. doi:[10.1016/j.compscitech.2009.05.002](https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2009.05.002)
- Petersen EJ, Henry TB (2012) Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes: review. *Environ Toxicol Chem* 31:60–72. doi:[10.1002/etc.710](https://doi.org/10.1002/etc.710)
- Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF (2007) Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett* 168:58–74. doi:[10.1016/j.toxlet.2006.11.001](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.11.001)
- Rakotomalala R (2005) TANAGRA: un logiciel gratuit pour l'enseignement et la recherche. RNTI-E-3. pp 697–702
- Rosca ID, Watari F, Uo M, Akasaka T (2005) Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon* 43:3124–3131. doi:[10.1016/j.carbon.2005.06.019](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2005.06.019)
- Schrus F, Lison D (2012) Focusing the research effort. *Nat Nanotechnol* 7:546–548
- Shvedova AA, Kisin ER, Porter D et al (2009) Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: two faces of Janus? *Pharmacol Ther* 121:192–204. doi:[10.1016/j.pharmthera.2008.10.009](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.10.009)
- Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'Hermite M et al (2008) In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* 253:137–146. doi:[10.1016/j.tox.2008.09.007](https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.007)
- Singh S, Vardharajula S, Tiwari P et al (2012) Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *Int J Nanomedicine* 5361. doi:[10.2147/IJN.S35832](https://doi.org/10.2147/IJN.S35832)
- Tran C, Tantra R, Donaldson K et al (2011) A hypothetical model for predicting the toxicity of high aspect ratio nanoparticles (HARN). *J Nanopart Res* 13:6683–6698. doi:[10.1007/s11051-011-0575-9](https://doi.org/10.1007/s11051-011-0575-9)
- Vietti G, Ibouaadana S, Palmari-Pallag M et al (2013) Towards predicting the lung fibrogenic activity of nanomaterials: experimental validation of an in vitro fibroblast proliferation assay. *Part Fibre Toxicol* 10:52
- Wang X, Xia T, Ntim SA et al (2010) Quantitative techniques for assessing and controlling the dispersion and biological effects of multiwalled carbon nanotubes in mammalian tissue culture cells. *ACS Nano* 4:7241–7252. doi:[10.1021/nm102112b](https://doi.org/10.1021/nm102112b)
- Wang X, Guo J, Chen T et al. (2012) Multi-walled carbon nanotubes induce apoptosis via mitochondrial pathway and scavenger receptor. *Toxicol In Vitro* 26:799–809. doi:[10.1016/j.tiv.2012.05.10](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.10)
- Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF (2006) Oops they did it again! carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett* 6:1261–1268. doi:[10.1021/nl060177c](https://doi.org/10.1021/nl060177c)
- Zhang X, Zhu Y, Li J et al (2011) Tuning the cellular uptake and cytotoxicity of carbon nanotubes by surface hydroxylation. *J Nanopart Res* 13:6941–6952. doi:[10.1007/s11051-011-0603-9](https://doi.org/10.1007/s11051-011-0603-9)
- Zhang T, Tang M, Kong L et al (2012) Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages. *J Hazard Mater* 219–220:203–212. doi:[10.1016/j.jhazmat.2012.03.079](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.079)

II.2. Supporting information

RAMAN SPECTRA

Raman spectra exhibited two main bands for both carbon nanotubes (CNT) types. They are called the D-band (1340 cm^{-1}) and the G-band (1570 cm^{-1}) (**Figure S1** and **Figure S2**). Two overtone peaks were also observed ($> 2500\text{ cm}^{-1}$).

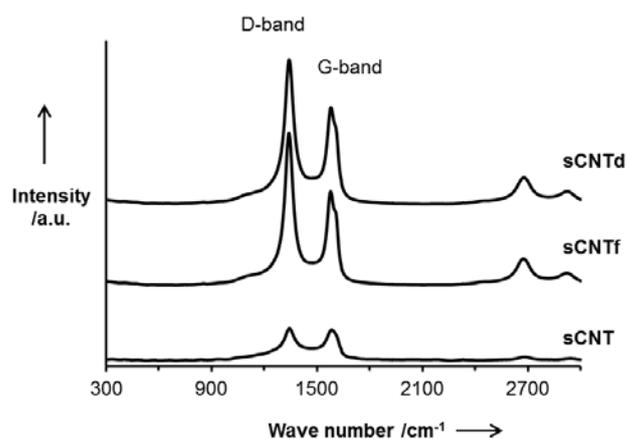


Figure S1: Raman spectra of small carbon nanotubes pristine (sCNT), functionalized (sCNTf), and desorbed (sCNTd) (a. u.: arbitrary units).

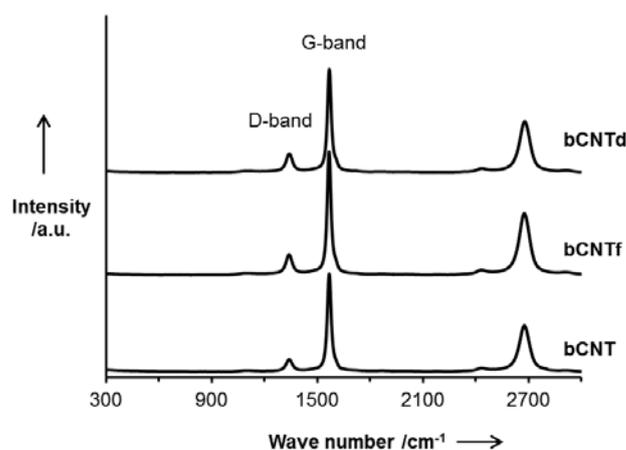


Figure S2: Raman spectra of the big carbon nanotubes pristine (bCNT), functionalized (bCNTf) and desorbed (bCNTd).

THERMAL DESORPTION

CO and CO₂ peaks were shifted for the bCNTf and reduced in intensity compared to those of small CNT. Higher intensities of CO and CO₂ releases were nonetheless observed when comparing bCNTf to bCNT and bCNTd (**Figure S3**). The shift in temperature observed for the gas desorption of small and big CNT was probably due the difference in carbon structure¹.

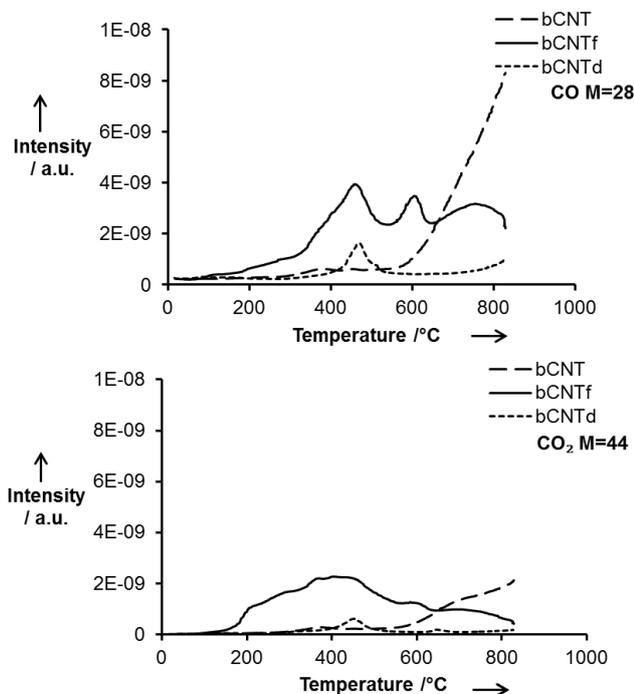


Figure S3: Thermal desorption of the big CNT, CO and CO₂ releases.

MICROSCOPIC OBSERVATIONS OF RAW 264.7 CELLS

A 24 h exposition of the cells to the smallest doses of CNT (15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for small CNT, and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for big CNT) was conducted directly on an 8-well chambered coverglass (Lab-Tek®). The cells were then rinsed twice with PBS, dried before a May-Grünwald Giemsa staining (MGG).

Optic microscopic images are presented in **Figure S4**. CNT interactions with the RAW macrophages were apparent: individual CNT and CNT agglomerates were preferentially located at the plasma surface of the cells. Small CNT whatever the surface treatment induced a cellular uptake which could be associated probably with a phagocytosis process. Activated macrophages with visible vacuoles containing CNT agglomerates were identified. Long and thin pseudopods are believed to be due to the macrophages adherence rather than directly to phagocytosis. Few dead cells were also observed, but their number seemed lesser than for the big CNT.

For the big CNT although some cells were activated, it was not obvious that phagocytosis occurred. Individual CNT were visible but neither those nor agglomerates were clearly observed into vacuoles. They could only adhere to the cell surface but hardly be engulfed by the macrophages. This is in accordance with the so-called frustrated phagocytosis known to happen with oversized CNT. Concerning the surface treatment, no clear difference in cell morphology was detected whatever the size of the CNT.

The same experiments were conducted for the highest doses of CNT ($120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for small CNT and $240 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for big CNT). However, despite three washing, the coverglass remained too loaded by CNT to allow relevant observations.

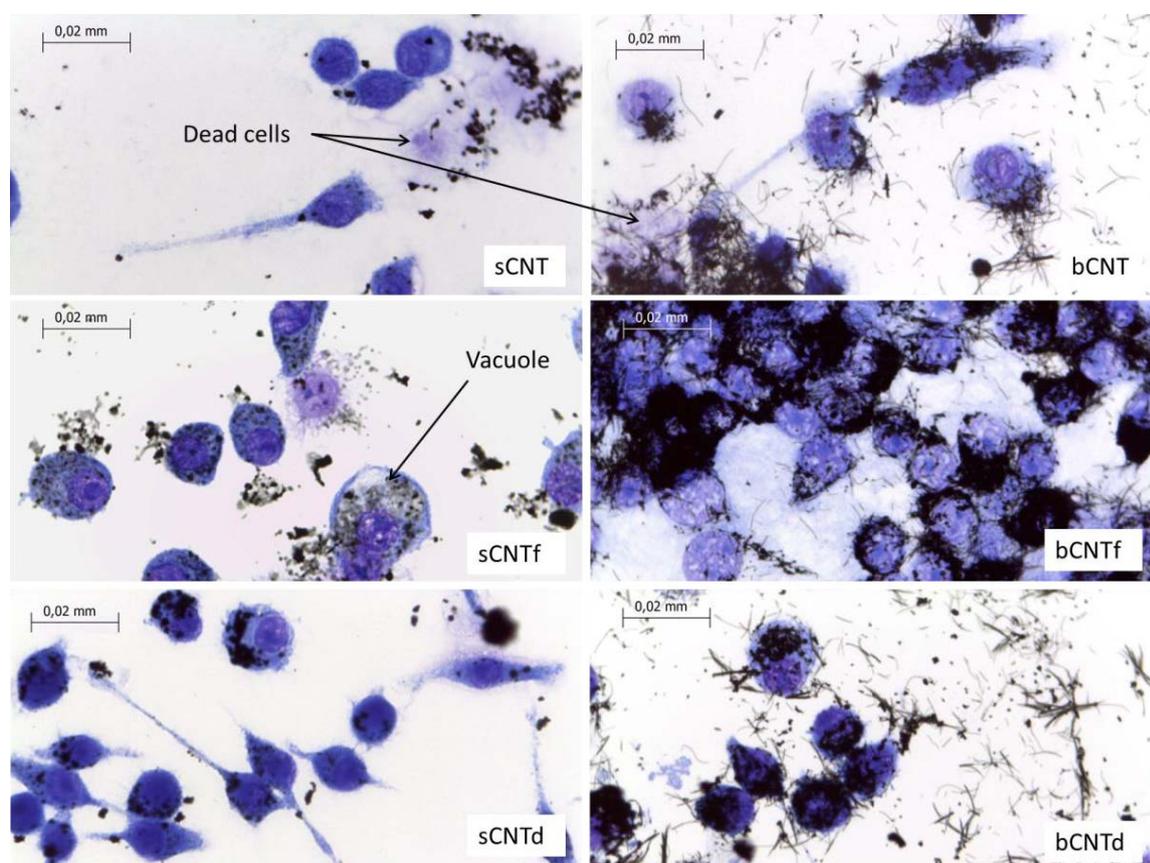


Figure S4: Microscopic images of RAW 264.7 cells exposed for 24h to $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of small and big CNT respectively after May-Grünwald-Giemsa staining.

BIAS CORRECTION FOR OXIDATIVE STRESS DETECTION

Oxidative stress caused by carbon nanotubes was assessed by the detection of reactive oxygen species (ROS). An acellular test was developed in order to obtain correction from the strong bias due to the presence of CNT in the culture supernatant. An experiment was carried out to measure the variations between the fluorescence obtained for 0, 10, 100, 1000 nM

standard curve of the fluorescent probe DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) realized in complemented medium without CNT and the biased fluorescence obtained after addition of carbon nanotubes in those DCF dilution. Corrections were calculated for each carbon nanotube type and each dose. An example for the pristine small carbon nanotubes is given in **Figure S5**, and the whole corrections are given in **Table S1**.

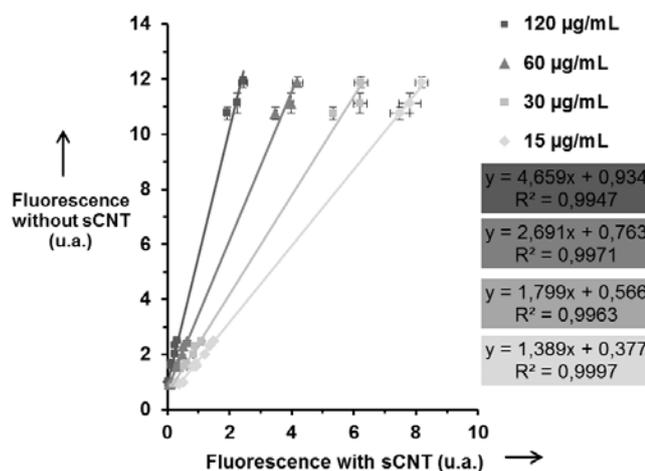


Figure S5: Bias between fluorescence of 0 to 10000 nM DCF, with and without pristine small carbon nanotubes (sCNT).

Table S1: Corrections of bias in the oxidative stress detection assay ($R^2 > 0.96$; small carbon nanotubes pristine: sCNT, functionalized: sCNTf, desorbed: sCNTd, big carbon nanotubes pristine: bCNT, functionalized: bCNTf, desorbed: bCNTd).

Powder	Correction at 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 240 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
sCNT	$y = 1.389x + 0.377$	$y = 1.799x + 0.566$	$y = 2.691x + 0.763$	$y = 4.659x + 0.934$	/
sCNTf	$y = 1.199x + 0.225$	$y = 1.400x + 0.357$	$y = 1.823x + 0.522$	$y = 2.660x + 0.638$	/
sCNTd	$y = 1.031x + 0.266$	$y = 1.072x + 0.421$	$y = 1.165x + 0.623$	$y = 1.365x + 0.833$	/
bCNT	/	$y = 1.267x + 0.291$	$y = 1.578x + 0.350$	$y = 2.214x + 0.437$	$y = 3.251x + 0.615$
bCNTf	/	$y = 1.344x + 0.221$	$y = 1.752x + 0.277$	$y = 2.423x + 0.427$	$y = 3.678x + 0.655$
bCNTd	/	$y = 1.341x + 0.215$	$y = 1.662x + 0.336$	$y = 2.340x + 0.492$	$y = 3.641x + 0.693$

TOXICITY OUTCOMES WITH DOSES EXPRESSED IN SURFACE

In **Figure S6** and **Figure S7** the LDH releases and TNF- α production induced by the six CNT are reported as a function of their surface, calculated thanks to the CNT specific surface area. The choice of dose metric for toxicity assays of nanoparticles is greatly discussed ^{2,3}. Surface is predominant at the nanoscale, but the only method to measure it by B.E.T. is imprecise, and mass dose currently remains the standard metric.

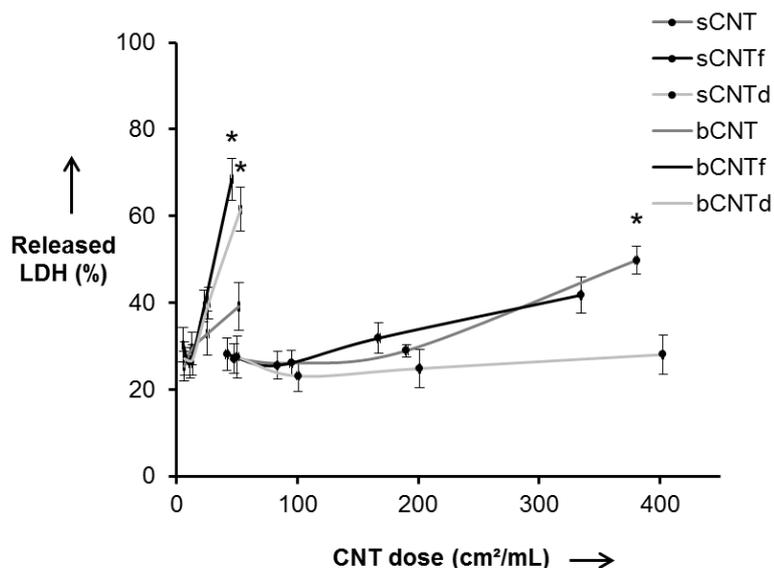


Figure S6: Cytotoxicity determined by LDH release after a 24 h exposition to CNT, reported to that of total cellular LDH measured after lyse of the negative control cells. Standard errors of the mean and statistical significant difference from the negative control (n=3, * p<0.05) are specified on the graph.

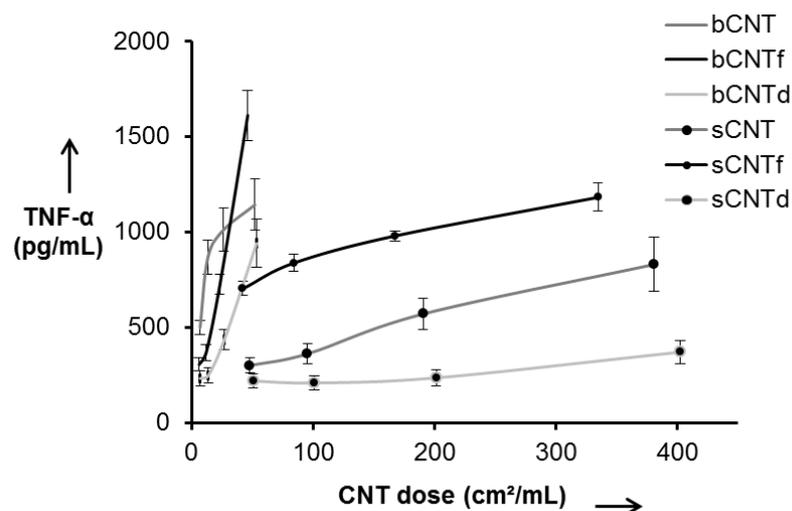


Figure S7: Inflammation determined by TNF- α production after a 24 h exposition to CNT. Standard errors of the mean (n=3) are specified on the graph. Statistical significant differences were not indicated for more readability.

REFERENCES

- (1) Boehm, H. P. (2002) Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment, Carbon 40, 145–149.
- (2) OECD. (2012) Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (3) Flahaut, E. (2012) Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos.

III. Données complémentaires

III.1. Interférences dans la mesure du stress oxydant

Comme nous l'avons évoqué au Chapitre 1, III.2.2., certains tests de toxicité sont biaisés par la présence de CNT. Cela a été reconnu principalement pour les tests de cytotoxicité comme le MTT ou le rouge neutre (Wörle-Knirsch et al. 2006; Belyanskaya et al. 2007; Casey et al. 2007; Monteiro-Riviere et al. 2009), mais aussi pour certains tests de génotoxicité (micronoyaux et test des comètes, Hirsch et al. 2011). Nous avons considéré que l'étude des interférences possibles du test ROS était une nécessité pour une interprétation fiable des données obtenues. En présence des CNT, surtout à dose massique élevée, le milieu de culture contenant les CNT étant très sombre, nous avons présupposé qu'un biais pouvait diminuer la détection de la fluorescence des sondes utilisées (**Figure 32**). Des essais complémentaires d'artéfacts sur le test LDH ont également été conduits par la suite et seront présentés dans le Chapitre 5. En outre, le test ELISA (« Enzyme-linked immunosorbent assay », test immuno-enzymatique) permettant le dosage du TNF- α demande de nombreuses séries de rinçage, éliminant *a priori* tous les CNT qui pourraient interférer avec le test. Pour la mesure du stress oxydant par la détection des ROS en revanche, comme nous le soupçonnions, un biais très important dû à la présence de CNT a été observé.



Figure 32 : Plaque 6 puits remplie avec différentes dilutions de CNT

En effet, la présence de CNT dans le milieu fait significativement diminuer la fluorescence émise et fausse la détection du fluorophore utilisé pour ce test (le DCF : 2', 7'-Dichlorofluorescéine). Des tests ont été réalisés en milieu acellulaire avec une solution standard de DCF. Des lois de corrections de l'atténuation de la fluorescence ont pu être définies et sont

fournies dans les informations complémentaires publiées en annexe de nos articles scientifiques. Il est à noter que l'atténuation de la fluorescence dépend du type de CNT (ou d'autres nanomatériaux de carbone, voir Chapitre 4). Elle dépend aussi de la concentration en CNT, avec une augmentation des interférences avec la dose massique de CNT. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce biais : interaction chimique entre le DCF et les CNT, adsorption du DCF sur les CNT, mais plus probablement un simple masquage de la fluorescence par le milieu concentré en CNT de couleur sombre. En fonction du type de CNT, la dispersion n'est pas la même, ainsi que le nombre de CNT pour une même concentration en masse. Ceci expliquerait donc les différences d'interférences entre les types de CNT. Au vu de l'importance de ces biais (diminution de la fluorescence jusqu'à 4 fois et demi), il apparaît nécessaire de réaliser ces tests de correction pour chaque analyse et avec tous les types de CNT utilisés.

III.2. Fonctionnalisation industrielle

Des premiers essais ont tout d'abord été réalisés avec des CNT fonctionnalisés par un industriel. Il s'agit des CNT issus de la fonctionnalisation acide des petits MWCNT utilisés dans l'article 1 (NC3101 de Nanocyl, issus des NC7000) (Figarol et al. 2014). L'avantage primordial de réaliser la fonctionnalisation acide au sein du laboratoire est de pouvoir en contrôler les caractéristiques. Il est toutefois intéressant de confirmer que notre traitement était comparable à un traitement industriel, et que les résultats de toxicité ne sont pas ou peu influencés par la différence d'échelle (laboratoire vs industriel). Cependant, pour des raisons de confidentialité, nous n'avions pas accès aux informations sur le traitement industriel effectué par Nanocyl. Dans cette discussion, nous nommerons sCNT les MWCNT bruts, ind. sCNTf les MWCNT fonctionnalisés à l'acide industriellement, sCNTf les MWCNT fonctionnalisés à l'acide au sein du laboratoire.

La méthodologie suivie est identique à celle de l'étude ayant aboutie à la publication de l'article 1. Une caractérisation physico-chimique complète a tout d'abord été conduite. La **Figure 33** illustre la morphologie des sCNT, ind. sCNTf et sCNTf. Les ind. sCNTf semblent de diamètre plus faible que les sCNT, voire que les sCNTf. Ceci a été confirmé par la mesure du diamètre moyen pour chacune des poudres (**Tableau 6**) : 23 ± 4 nm pour les bruts, 16 ± 5 nm après fonctionnalisation au laboratoire, et 14 ± 4 nm après fonctionnalisation industrielle. Ce diamètre moyen des ind. sCNTf, quoique plus faible, n'était pas significativement différent de celui des sCNTf. Le taux de désordre structurel, donné par le rapport Id/Ig des pics du spectre Raman (**Tableau 6** et **Figure 34**), était lui aussi plus élevé que celui des sCNT bruts dû à l'attaque acide. Toutefois, il est légèrement plus faible que celui des sCNTf, indiquant un taux de défaut moins élevé. La surface spécifique (SSA) des ind. sCNTf est plus élevée que celle des bruts ou des fonctionnalisés au laboratoire. Le traitement industriel dispose peut-être d'une

étape limitant la formation d'agglomérats lors du séchage de la poudre (rinçage plus poussé à l'éthanol par exemple).

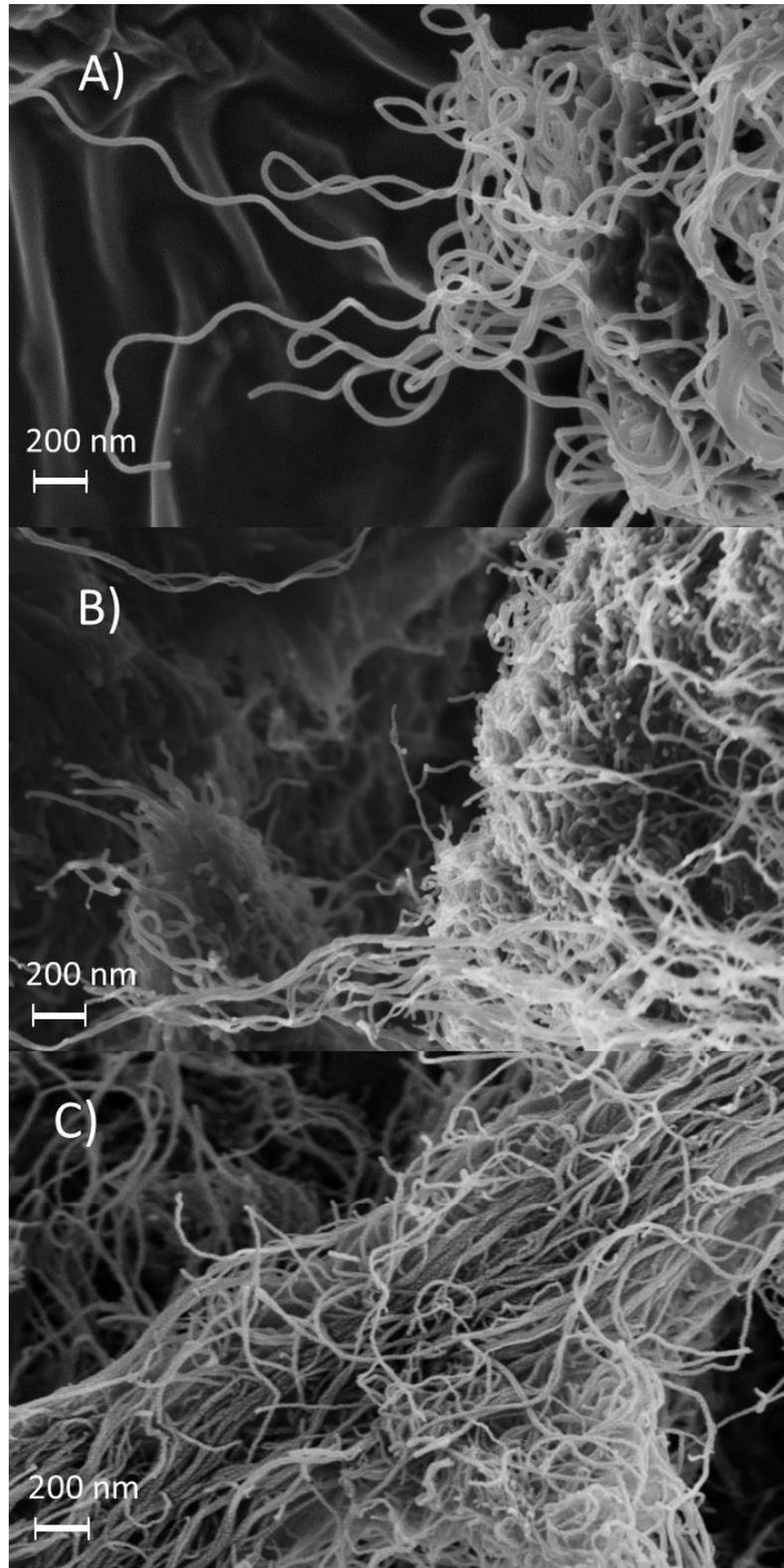


Figure 33 : Image de microscopie à balayage (FEG-SEM), A) nanotubes de carbone bruts (sCNT), B) fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf), et C) fonctionnalisés à l'acide au laboratoire (sCNTf).

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques de nanotubes de carbone bruts (sCNT), fonctionnalisés à l'acide par un industriel (ind. sCNT) et au sein du laboratoire (sCNTf).

Echantillon	sCNT	ind. sCNTf	sCNTf
Diamètre (nm)	23 ± 4	14 ± 4	16 ± 5
Désordre structurel (Id/Ig)	0,82	1,75	1,83
SSA ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$)	317 ± 2	358 ± 1	279 ± 1
Impuretés catalytiques (%m)	Fe 0,15	0,04	0,05
	Al 4,83	0,03	0,03
	Co 0,13	0,02	0,02
O (% atomique)	2	/	13
Potentiel zêta dans l'eau (mV)	-9 ± 8	-28 ± 7	-48 ± 2
Point isoélectrique dans l'eau (pH)	$4,25 \pm 0,86$	$1,33 \pm 0,65$	$< 1,5$

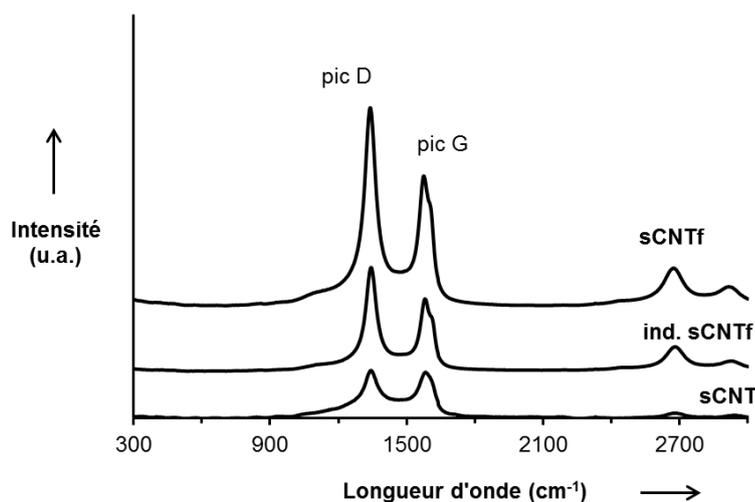


Figure 34 : Comparaison des spectres Raman de nanotubes de carbone bruts (sCNT), fonctionnalisés à l'acide par un industriel (ind. sCNT) et au sein du laboratoire (sCNTf).

Les deux principaux effets physico-chimiques de la fonctionnalisation acide de CNT ont été également constatés pour les ind. sCNTf. Ils étaient purifiés (voir résultats de l'analyse ICP-AES dans le **Tableau 6**), et présentaient des groupements acides en surface. Les résultats de TDS (**Figure 35**) ont ainsi montré la présence de groupements oxygénés en surface des ind. sCNTf (en traits pleins). Les mesures d'XPS n'ont malheureusement pas pu être réalisées sur les ind. sCNTf. Les mesures de potentiel zêta et du pI ont confirmé la présence d'une charge de surface due aux groupements acides fonctionnalisés. Le potentiel zêta des ind. sCNTf est plus proche de celui des bruts que ne l'est celui des sCNTf. Il est donc possible que ces ind. sCNTf présentent moins de groupements acides que des sCNTf. Cependant, les pI, plus fiables car non liés aux variations de pH sont très proches.

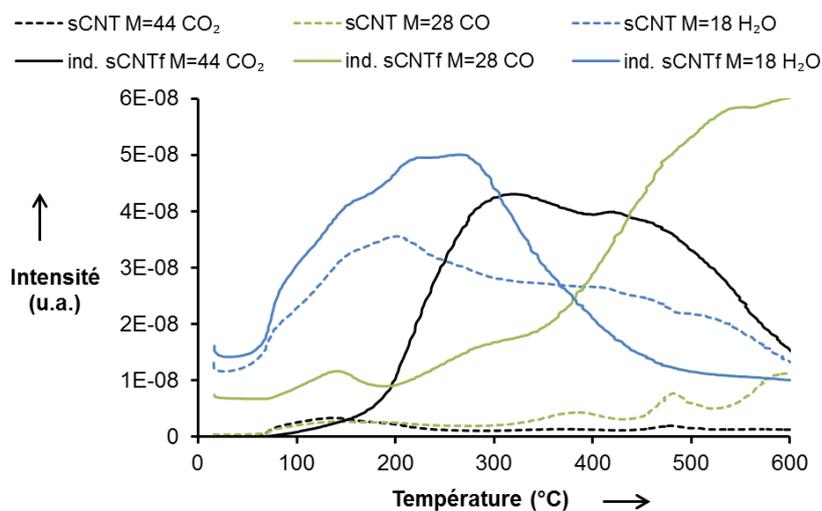


Figure 35 : Suivi par thermodésorption de la composition chimique des espèces adsorbées en surface de nanotubes bruts (sCNT) et fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf).

Les caractéristiques physico-chimiques des ind. sCNTf sont globalement proches de celles des sCNTf, indiquant que nous avons réalisé une fonctionnalisation acide au laboratoire équivalente de celle réalisée industriellement. Il est toutefois possible que la nature des groupements oxygénés greffés en surface des CNT soit différente. Pour le confirmer, des analyses XPS avec une déconvolution des pics, ou une analyse infra-rouge aurait été nécessaire. Nous allons voir que les impacts biologiques de la fonctionnalisation acide industrielle ou réalisée en laboratoire sont également très proches.

Les observations microscopiques de la morphologie des macrophages ont été réalisées suite à un protocole légèrement différent de celles réalisées pour les articles. En effet, au lieu d'utiliser des Lab-Tek[®] permettant la culture directe de cellules sur les lames de microscope, les macrophages ont ici été cultivés en plaque 12 puits, puis étalés sur les lames à l'aide d'une cyto-centrifugation. La **Figure 36** nous montre ainsi des cellules étalées et plus stressées par le procédé. Les macrophages exposés aux sCNT bruts ou aux ind. sCNTf sont activés, et présentent de nombreuses vacuoles. La présence de fines vacuoles est habituelle, mais la taille de celles visibles en présence de CNT est signe d'une activation des macrophages. La présence d'agglomérats de CNT au sein des macrophages permet de suggérer qu'un processus de phagocytose ait été activé. Nous n'avons pas reconduit ce protocole pour les études suivantes afin de limiter les stress subit par les cellules lors de la cyto-centrifugation. Ces stress pourraient conduire à la mort cellulaire de cellules déjà fragilisées par les CNT.

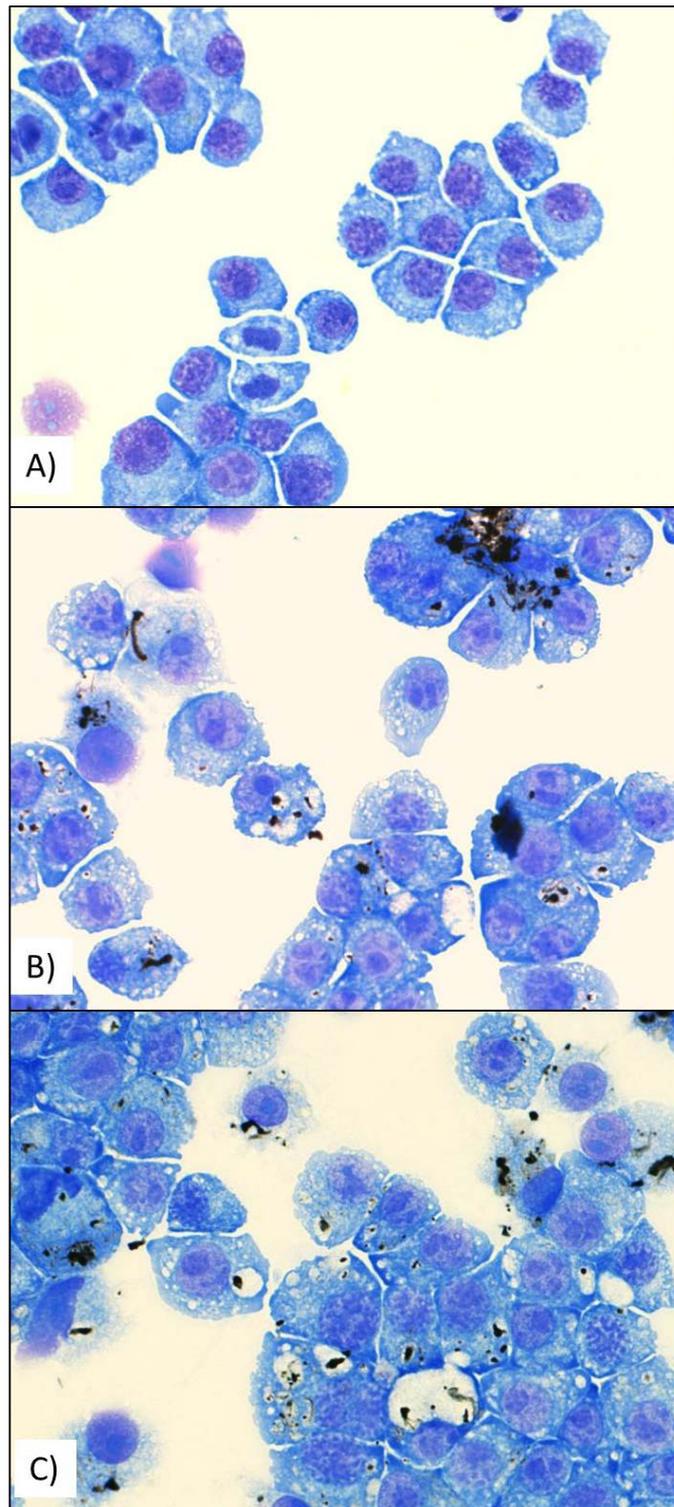


Figure 36 : Macrophages murins RAW 264.7 après coloration MGG, après étalement sur une lame par cytopspin. A) cellules témoins, B) cellules exposées 24 h à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone bruts, C) cellules exposées 24 h à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone fonctionnalisés à l'acide industriellement.

Les résultats du test de cytotoxicité sont présentés en **Figure 37**. Les sCNTb et ind. sCNTf n'induisent aucun relargage significatif de LDH dans le milieu quelle que soit la dose utilisée. Dans notre article, nous avons pourtant décrit une cytotoxicité à $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ des sCNT bruts. Cependant, dans l'article la valeur de référence de LDH relarguée par les cellules seules du témoin négatif était légèrement plus élevée que celle-ci (30% contre 20% dans le cas présent). L'état initial vital des macrophages pourrait engendrer une différence de sensibilité à l'exposition aux CNT, notamment à la plus forte dose. De plus, ces expériences ont été réalisées dans des laboratoires différents avec deux spectrophotomètres de la même marque mais d'ancienneté différente.

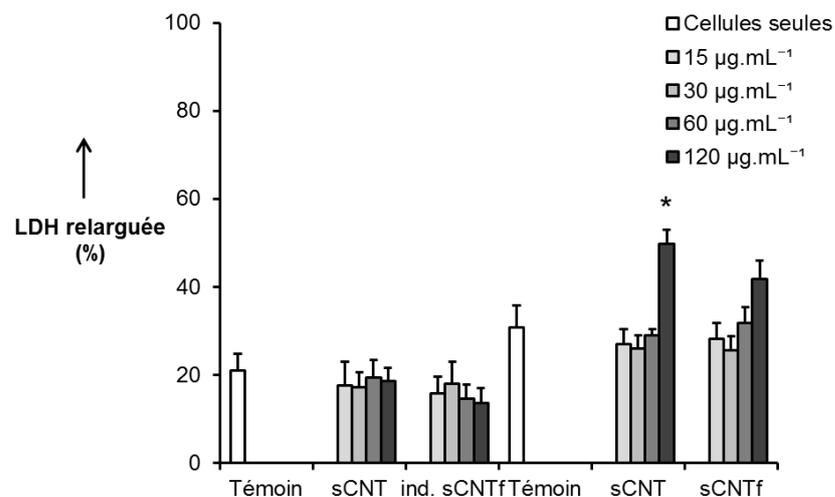


Figure 37 : Etude de la cytotoxicité par mesure de la LDH relarguée après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (sCNT) ou fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf).

La **Figure 38** montre une augmentation de la production de $\text{TNF-}\alpha$, dose-dépendante, suite à la fonctionnalisation des sCNT. Ce constat rejoint celui de l'article, où nous avons démontré que cette augmentation de la réponse pro-inflammatoire était due à la présence des groupements acides fonctionnalisés. L'augmentation est plus importante pour les ind. sCNTf que pour les sCNT (rapport de 2 et de 1,5 respectivement à $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Mais ici aussi, cela pourrait venir du taux de $\text{TNF-}\alpha$ produit par les cellules seules (témoin négatif) plus élevée dans l'article que dans cette étude (325 contre 170 pg.mL^{-1}), et du changement de laboratoire.

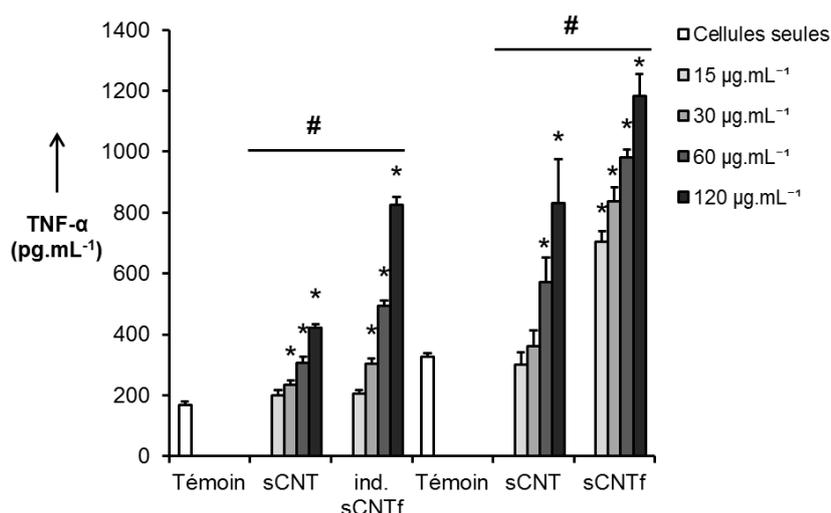


Figure 38 : Etude de la réponse pro-inflammatoire par dosage du TNF- α après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (sCNT) ou fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), # : résultats significativement différent entre les types de CNT.

La production de ROS, elle aussi dose-dépendante, est diminuée après fonctionnalisation industrielle des sCNT (**Figure 39 A**). Cependant, les niveaux de ROS en nM de DCF présentés dans l'article n°1 sont 6 à 7 fois plus élevés que ceux de ces expériences avec les ind. sCNT (**Figure 39 B**). Nous pouvons supposer que la différence de niveau entre ces expériences effectuées dans deux laboratoires différents provienne des variations dans le mode opératoire, dans l'intensité du spectre fluorescent émis, dans le détecteur du fluoroscope ou bien dans des variations de concentration ou conservation des réactifs des kits. Les tendances restent identiques : diminution des ROS après fonctionnalisation, néanmoins cela nous fait souligner les difficultés de comparaison inter-laboratoire des résultats des tests de toxicité. L'étude de Lanone et al. (2009) a ainsi mis en évidence que les résultats de cytotoxicité de nanoparticule pouvaient varier entre laboratoire. Plus récemment, Poland et al. (2014) ont encore souligné ce problème de reproductibilité en toxicologie. Il paraît donc important de se focaliser sur les tendances décrites par ces tests plus que par les données elle-même.

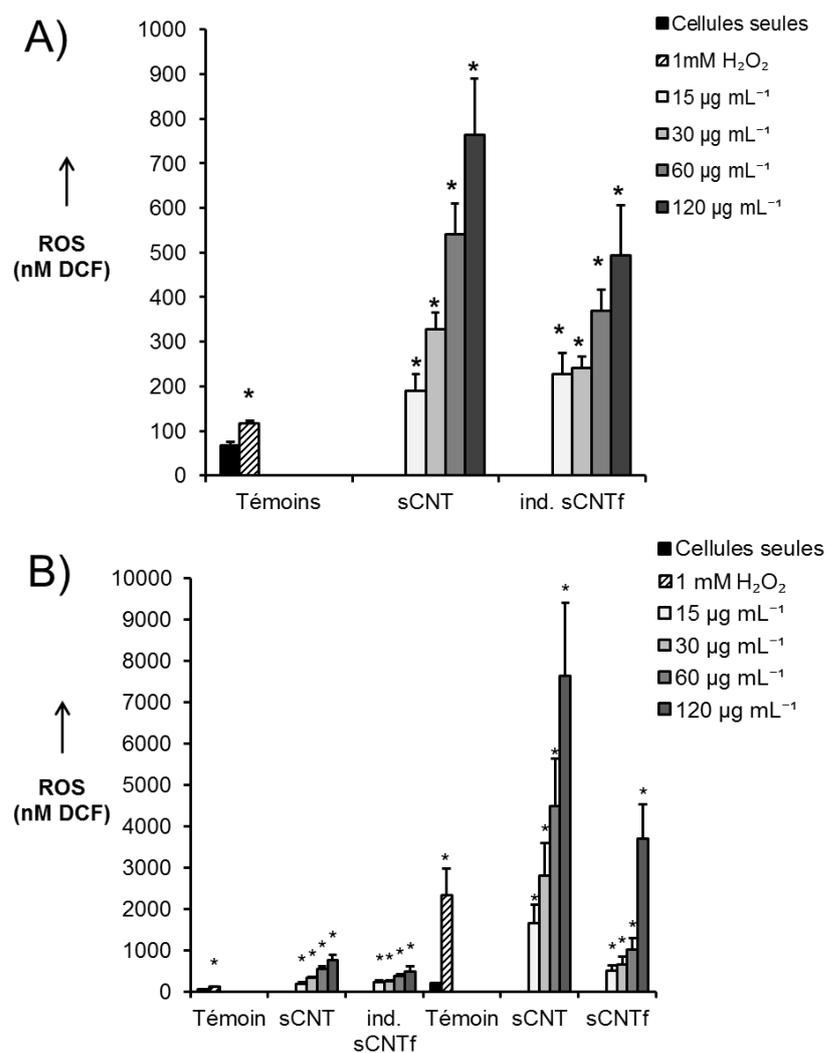


Figure 39 : Etude du stress oxydant par dosage des ROS après 90 min de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (sCNT) ou fonctionnalisés à l'acide industriellement (ind. sCNTf). *: significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$).

BILAN CHAPITRE 2 :

Impacts biologiques d'une fonctionnalisation acide

La fonctionnalisation acide de CNT a deux principaux effets physico-chimiques : l'addition de groupements acides et la purification des impuretés catalytiques métalliques. A travers l'étude de deux types de MWCNT, nous avons vu l'importance de distinguer l'impact biologique de ces deux effets. La présence de groupements acides augmente la réponse pro-inflammatoire et pourrait légèrement accroître la cytotoxicité. D'un autre côté, l'élimination des impuretés catalytiques diminue fortement le stress oxydant et peut-être légèrement la cytotoxicité. Cette même tendance a été observée que les CNT soient fonctionnalisés à l'acide de manière industrielle ou en laboratoire.

Il est important de constater que les réponses cellulaires des macrophages murins étaient différentes suivant le type de CNT utilisé. Les grands CNT recuits n'induisaient notamment pas de stress oxydant. Nous avons émis l'hypothèse que cela était dû principalement au taux de purification élevé de ces CNT recuits. Il serait toutefois aussi possible que le taux de défauts de structure soit également mis en jeu dans les mécanismes de stress oxydant.

Chapitre 3. Impacts biologiques d'un recuit haute température

I. Introduction et méthodologie

Dans ce chapitre, nous étudierons l'impact d'un recuit haute température de CNT sur leur toxicité pulmonaire. Les nanotubes utilisés correspondaient à un nouveau lot de MWCNT NC7000 (Nanocyl), identiques aux sCNT de l'étude précédente. Les techniques utilisées pour la caractérisation physico-chimique des CNT bruts et recuits, ainsi que pour la caractérisation de la réponse cellulaire, sont également les mêmes que celles du Chapitre 2, et sont présentées en Annexe A1. Méthodes.

Le recuit haute température de CNT sous atmosphère protectrice permet, comme la fonctionnalisation acide, de purifier les CNT des impuretés catalytiques, mais aussi, au-delà d'une température de 1600 ou 2000 °C, de diminuer le taux de défauts de structure (voir Chapitre 1, III.3.3.). Les effets physico-chimiques d'un tel traitement sont bien documentés (Chen et al. 2007; Bougrine et al. 2001; Yamamoto et al. 2014) mais l'impact sur la réponse cellulaire est moins connu. Nous nous proposons d'étudier ici les impacts de CNT bruts et de CNT recuits sur la réponse cellulaire macrophagique.

Pour réaliser le traitement de recuit à haute température, nous avons utilisé un four de traitement sous vide (VAS) avec injection d'argon lors de la phase de chauffe. Environ 250 mg de CNT ont été déposés dans un creuset en graphite tapissé de papier carbone. Ce creuset a ensuite été déposé dans l'enceinte en graphite du four VAS programmé de cette manière :

1. Dégazage sous vide de 18 h
2. Chauffage jusqu'à 300°C à 10°C.min⁻¹
3. Palier de dégazage sous vide de 5 h
4. Dégazage sous Ar de 18 h
5. Chauffage jusqu'à 2150°C à 10°C.min⁻¹
6. Palier à température maximale maintenu pendant 1 h
7. Refroidissement à 20°C.min⁻¹ jusqu'à 40°C.

Plusieurs essais ont été réalisés afin d'obtenir une diminution optimale du taux de défauts de structure (mesurée par le rapport Id/Ig par spectrométrie Raman). Deux essais ont été réalisés avec une température maximale de 2000°C maintenue pendant 2 et 3 h. Les rapports Id/Ig montraient un plus fort taux de défauts de structure uniquement pour le dernier essai à 2125°C maintenu pendant 1 h. Ayant atteint les capacités maximales du four, il ne nous a pas été possible de maintenir le palier de température pendant plus d'1 h ou d'augmenter cette température maximale.

L'impact du recuit à 2125°C des MWCNT (CNTa) sur la réponse cellulaire de macrophages murins (RAW 264.7) est présenté dans l'article suivant soumis à *Chemical Research in Toxicology*.

Les données toxicologiques des MWCNT recuits issus des deux premiers essais (CNT2 pour 2 h à 2000°C, et CNT3 pour 3 h à 2000°C) seront présentées en données complémentaires.

II. Publication 2

II.1. Article soumis à Journal of Nanoparticle Research

THERMAL ANNEALING OF CARBON NANOTUBES REVEALS A TOXICOLOGICAL IMPACT OF THE STRUCTURAL DEFECTS

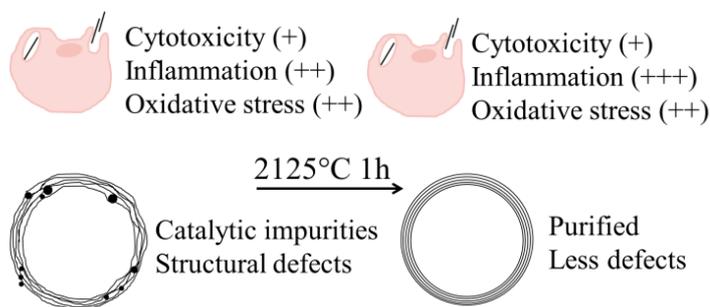
Agathe Figarol ^{† ‡ *}, Jérémie Pourchez ^{‡ *}, Delphine Boudard [#], Valérie Forest [‡], Sarah Berhanu [€], Jean-Marc Tulliani ^β, Jean-Pierre Lecompte [□], Michèle Cottier [#], Didier Bernache-Assollant [‡], Philippe Grosseau [†]

[†] Ecole Nationale Supérieure des Mines, SPIN-EMSE, CNRS: UMR 5307, LGF, F-42023 Saint-Etienne (France), [‡] Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, EA 4624, SFR IFRESIS, LINA, F-42023 Saint-Etienne (France), [#] Université Jean Monnet Saint-Etienne, EA 4624, SFR IFRESIS, LINA, F-42023 Saint-Etienne (France), [€] Armines - Mines ParisTech, Centre des Matériaux, CNRS UMR 7633, F-91003 Evry (France), ^β Politecnico di Torino, Department of Applied Science and Technology, 10129 Torino (Italy), [□] SPCTS, Centre Européen de la céramique CNRS: UMR 7315, F-87068 Limoges, (France).

* Correspondence to: figarol@emse.fr or pourchez@emse.fr

KEYWORDS: carbon nanotubes, annealing, high temperature treatment, oxidative stress, inflammation, defects

TABLE OF CONTENTS GRAPHIC



ABSTRACT:

The biological response to pristine and annealed multi-walled carbon nanotubes were assessed on murine macrophages (RAW 264.7). First, the physicochemical features of as-produced multi-walled carbon nanotubes and annealed over 2100°C for 1 h were fully characterized. A decrease in structural defects, hydrophobicity and catalytic impurities were detected after annealing. Thereafter, their impact on cytotoxicity, oxidative stress, and pro-inflammatory response was investigated in vitro on a macrophage cell line at final concentrations of 15 to 120 µg.mL⁻¹. No effect of the high thermal treatment was detected on the cytotoxicity, but the annealed carbon nanotubes showed a significant increase of the pro-inflammatory response. This suggests that the reduction in structural defects may modify the protective layer of adsorbed biomolecules. Surprisingly, the purification from metallic catalysts did not have any significant effect on the oxidative stress. It suggested that the structural improvements from the high thermal treatment decreased the carbon nanotube scavenging capacity and allow a higher free radical release which may counterbalance the effect of the purification.

INTRODUCTION

Carbon nanotubes (CNT) have received a great deal of attention since their full description in the early 1990s¹. CNT have demonstrated high electric and thermal conductivity, exceptional mechanical resistance and adsorption capacity leading to numerous studies in academic and industrial research^{2, 3}. However, CNT are classified as inhalable fibers due to their small aerodynamic diameter. Common public opinion associates their morphological resemblance to asbestos fibers and this raises health concerns. Based on the scientific literature, the biological impact of inhaled CNT remains uncertain, but it has been shown that this nanomaterial has the capacity to trigger pathogenic pathways. In vivo studies on rat and mice have reported evidences of inflammation, formation of granulomas, fibrotic structures and oxidative stress⁴⁻⁶. Similarly, cell exposure to CNT could trigger cytotoxicity, pro-inflammatory response, and oxidative stress⁷⁻⁹. Nonetheless, available data are still fragmentary and often contradictory. The use of different biological models and toxicity assessment methods, as well as the lack of physicochemical data in the nanotoxicology studies can partially explain these contrasting findings. Thus, one of the main keys to improve our understanding of CNT toxicity is the knowledge of the biological impact of their physicochemical features¹⁰⁻¹².

Surface treatments of as-produced CNT change their properties and enlarge their potential applications. High temperature treatment, also called thermal annealing or graphitization, has been well-documented as a way to improve the purity (i.e. decrease of metallic impurity content) and structural order of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). Common production techniques of MWCNT such as chemical vapor deposition (CVD) require the use

of metallic nanoparticles as catalysts. As a result, metal residues are classically found entrapped in MWCNT or on their surface. Moreover, these MWCNT are non-perfect cylindrical graphene sheets and exhibit structural defects in crystalline lattices mainly associated to sp^3 carbon hybridization¹³. According to Bougrine et al.¹⁴ annealing MWCNT at 1600°C under argon reduces the level of catalytic impurities due to the evaporation vanishing of metal particles. Besides, over 1600°C the carbon interlayer spacing starts to contract, with better results obtained at 2400°C. Boncel et al.¹⁵ suggested that metallic impurities gradually escape as vapors through one CNT open end at a temperature for which a sufficiently high vapor pressure of metal is achieved. Chen et al.¹⁶ confirmed this purification and structural enhancement with a threshold value of 1800°C. Heat treatment time was prolonged from 2 to 60 min at the maximum temperature. They stated that the effect of duration time was much lower than that of annealing temperature. Enhancement of MWCNT crystallinity appears to improve their electric conductivity, which could be of great interest for microelectronic or biomedical applications¹⁶. Similarly, their axial strength and Young's modulus are improved, encouraging the development of high performance composite material^{18,19}.

Nowadays, the availability of annealed MWCNT on the market is increasing while their effects on health are still not fully understood. In fact, Fiorito et al.¹⁷ compared MWCNT purified by acid functionalization or by annealing at 2400°C and concluded that the latter were less cytotoxic but induced a higher pro-inflammatory response on primary human macrophages. Contradicting results from Simon-Deckers et al.²⁰ evidenced no impact on the cytotoxicity of human epithelial cells (A549) of MWCNT annealed at 2000°C compared to raw MWCNT shortened by ultrasonication. Cheng et al.²¹ reached a similar conclusion when comparing MWCNT annealed at 2600°C and raw MWCNT on human monocyte-derived macrophages (HMM). A more complete study was published as two companion papers^{22,23} and assessed the physicochemical and biological effect of annealing MWCNT at 2400°C. In vitro genotoxicity on lung epithelial cells (RLE) seemed to be slightly reduced by this thermal treatment. A decrease in cytotoxicity and inflammation was furthermore observed in vivo on Wistar rats after intra-tracheal instillations (2 mg/rat). However, high levels of cytotoxicity were observed again after a 6 h grinding. Fenoglio et al.²² and Muller et al.²³ suggest thus that the positive effect on cytotoxicity and pro-inflammatory response was mainly occasioned by the decrease in surface reactive sites due to the higher structural order. Unfortunately, the effects on oxidative stress have not been directly studied as a cellular response. However, in acellular conditions, annealed MWCNT demonstrated a lower scavenging capacity of the oxygen radicals^{22, 23}. Furthermore, no MWCNT directly generated any oxidative species. The scavenging activity of CNT corresponds to their antioxidant capacity. Thus, it lowers the concentration of reactive oxygen species (ROS) of the external medium. This activity has been shown to be enhanced by lattice defects^{22, 24, 25}. To our knowledge, few studies have been conducted on the impact of the oxidative stress of the CNT purification by an annealing

treatment. A link between catalytic impurities and oxidative stress has been suggested²⁶⁻²⁹. Fe is often used as a catalyst for CNT production and is implicated in the Fenton reaction: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$ ²⁶⁻²⁸. Bussy et al.²⁹ exposed a mechanism of release of Fe impurities in the acidic lysosomes after internalization of CNT in murine macrophages. Al, another metallic catalyst, is a non-redox-active metal, however it can have a strong pro-oxidant activity³⁰⁻³². Al-superoxide could indeed stabilize ferrous ion by reducing its rate of oxidation. It thus indirectly promotes the production of ROS with the use of the ferrous ions in the Fenton reaction. Furthermore, Zhang et al.³³ compared the cellular response of HeLa cells exposed to MWCNT annealed at 2400°C, oxidized by a HNO_3 treatment or irradiated with ^{60}Co . Annealed MWCNT exhibited a lower level of structural defects than oxidized or irradiated MWCNT. The induced oxidative stress and cytotoxicity was also lower for annealed CNT. Liu et al.³⁴ focused on the acellular activity of an antioxidant, the glutathione (GSH). All the studied carbon-based nanomaterials, including CNT, were linked with a dose-dependent decrease of GSH concentration in the acellular medium. With annealed carbon black (at 2600°C) however, the final GSH concentration was higher than with pristine carbon black. These two studies suggest a relationship between structural defect and oxidative stress.

Further studies have assessed the biological response towards annealed MWCNT but without any comparison to raw MWCNT. Hirano et al.³⁵ showed a high cytotoxicity of MWCNT annealed at 2600°C which was not linked to apoptosis or oxidative stress, along with a low inflammation. Data from Tsukahara and Haniu³⁶ also indicated a dose-dependent cytotoxicity with no sign of apoptosis and oxidative stress, but some cytokines levels were increased (IL-6 and IL-8 but not $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-10 and IL-12) indicating a medium pro-inflammatory response.

Overall, few toxicological studies are available with full comparison of pristine and annealed MWCNT and results are contradictory with very few studies on oxidative stress. In the present work, characterization and in vitro biological assessments of the role of catalytic impurities and structural defects were conducted on as-produced and annealed MWCNT at 2125°C.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

1. Powders and thermal annealing treatment of MWCNT

MWCNT (Nanocyl NC7000, Rue de la Vacherie 236, Auvélais, Belgique) were synthesized by CVD and have a diameter of 9.5 nm and a length of 1.5 μm according to the manufacturer. As-produced MWCNT were labelled CNT. For the annealing treatment, these CNT were allowed to degas under vacuum overnight then were heated at $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ until 200°C and remained at this temperature for 5 h under vacuum and 18 h under argon. The annealed treatment started then, with a heating rate of $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ until the maximal temperature of

2125°C was reached and hold for 1 h. The resulting annealed carbon nanotubes were labelled CNTa. All weighing and the maximum of dried powder manipulations were conducted under an extractor hood in an enclosed laboratory at low pressure.

2. Physicochemical characterization of MWCNT

Field-emission scanning electron microscopy (FEG-SEM, JEOL JSM 6500F, Akishima, Tokyo, Japan) at 2 kV was used to characterize the CNT morphology and diameter. A few milligrams of MWCNT powder were put on a carbon-coated holey film. Samples were coated with a 3 nm gold layer before FEG-SEM observations. 100 MWCNT diameters per picture were measured by means of ImageJ software (3 pictures were used for a total of 300 measurements). The enhancement in structural order was monitored by Raman spectroscopy (XploRA, Horiba Scientific, rue de Lille, Villeneuve d'Ascq, France) on dry powder. A laser at 532 nm, a x50 objective, 20 acquisitions of 20 s were used with, first, a 1200 T network for a spectra between 200 and 3000 cm^{-1} , then a 2400 T network, giving a spectra between 1000 and 2000 cm^{-1} for the Id/Ig characterization. Two usual bands are indeed typical of CNT. The D-band intensity (D for disorder) is linked to the sp^3 hybridized carbon, and increases with ill-organized graphite structure³⁷. The G-band (G for graphite) corresponds to a splitting of the E_{2g} stretching mode of graphite and is independent of the structural defects. Therefore, the ratio of both intensities Id/Ig informs on the level of structural defects. Id/Ig values are the mean of at least four independent measurements. Diameters and CNT morphology were moreover analyzed by high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM). HR-TEM images were acquired on a Tecnai F20 ST microscope (FEI company) operating at 200 kV with a field emission gun as the electron source. The samples were prepared by dispersion in ethanol and subsequent ultrasonication. A small amount of the dispersion was then deposited on a TEM copper grid coated with a holey carbon film (Agar Scientific, Elektron Technology UK Ltd, Stansted, Essex, CM24 8GF, United Kingdom). The specific surface area (SSA) was determined by N_2 adsorption at 77 K after out-gassing for 4 h at 110°C (Micromeritics ASAP 2000, Micromeritics Corporate Headquarters, 4356 Communications Dr., USA) using the Brunauer–Emmet–Teller (B.E.T.) method. The purification from catalytic impurities was assessed by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) identifying trace metals after mineralization by nitro-hydrochloric acid. Furthermore, to fully characterize the MWCNT, X-Ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used to analyze the surface chemistry. The oxygen atomic percentages were obtained by analyzing the ratio between the intensities of the O_{1s} and C_{1s} XPS peaks (with 20% incertitude, monochromatized Al $K\alpha$ source, 400 μm width analyzed, 1.3×10^{-7} Pa of residual pressure, Thermo VG ThetaProbe, Thermo Fisher Scientific Inc., Wyman Street, Waltham, USA). Samples were prepared by the sonication of a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ CNT suspension in ethanol (5 to 15 min, 30%, 3 mm probe, Branson Sonifier SD450, Parc d'Affaires Silic, Rungis, France). One drop was deposited and dried on a 1 cm^2 silicon wafer previously covered by a thin layer of gold. The spectra were

corrected for Shirley-type backgrounds. Automatic search of the peak positions were conducted from the fixed C_{1s} peak at 284.5 eV. Atomic percentages were calculated from the peak areas and given sensitivity factors. Assessment of the surface chemistry was completed by thermal desorption spectroscopy (TDS, supplementary data **Figure S1**). 10 mg of powder were heated under vacuum at a heating rate of $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ until 850°C . Two turbomolecular pumps ensure a vacuum of less than 10^{-2} Pa from air atmosphere. A mass spectrophotometer (Balzers QMG 112 quadrupole, Iramali 18, Balzers, Liechtenstein) collected and analyzed the volatilized elements. Zeta potentials were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) and $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ carbon nanotubes suspensions in deionized water or culture medium prepared by sonication (5 min, 30%, 3 mm probe, Branson Sonifier).

3. Preparation of MWCNT suspensions for the toxicity assays

0.80 mg of MWCNT were weighed and dispersed in 5 mL of culture medium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% of fetal calf serum (Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (penicillin $10,000\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, streptomycin $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). A 5 min sonication was performed to fully disperse each MWCNT sample (3 mm probe, 30% power, Branson Sonifier S-450D). Serial dilutions were conducted to obtain concentrations of 160, 80, 40, $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of MWCNT in supplemented culture medium DMEM. For the toxicity assays, $25\ \mu\text{L}$ of cell suspension were supplemented by $75\ \mu\text{L}$ of the MWCNT suspension (1/4 cells, 3/4 MWCNT). The final concentrations were 120, 60, 30, and $15\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The suspension stability over a week was established by dynamic light scattering (ZetaSizer Nano ZS). It measured the average hydrodynamic diameter of the equivalent sphere with a density of 1 with the same translational diffusion coefficient.

4. In vitro toxicity assays

4.1. Cell culture of RAW murine macrophages

The RAW 264.7 murine macrophage cell line was provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem LGC, Queens Road, Teddington, Middlesex, United Kingdom). It derived from mice peritoneal macrophages transformed by the Albeson Murine Leukemia Virus. Cells were grown in 10% fetal calf serum supplemented DMEM and maintained at 37°C under a 5% carbon dioxide humidified atmosphere.

4.2. Cytotoxicity of murine macrophages after exposure to MWCNT

The cells were seeded in a 96-well plate at 100,000 cells/well and incubated with the MWCNT for 24 h. Cell viability was then evaluated by quantifying the Lactate dehydrogenase (LDH) released from cells with damaged membranes using the CytoTox-96® Non-radioactive

Cytotoxicity Assay (Promega, Woods Hollow Road, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. Detection was performed using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc., Wyman Street, Waltham, USA) at 450 nm. The activity of the released LDH was reported as a percentage of the total cellular LDH (measured after the complete lysis of control cells).

4.3. Pro-inflammatory response of murine macrophages after exposure to MWCNT

In parallel to the cytotoxicity test, 100,000 cells/well were seeded in a second 96-well plate and incubated with the MWCNT for 24 h. Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) release was assessed using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (Quantikine[®] Mouse TNF- α /TNFSF1A Immunoassay, R&D systems Inc., McKinley Place NE, Minneapolis, USA). The optical density was determined according to the manufacturer's instructions, using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific) at 450 nm. A standard curve was established and results were expressed in pg.mL⁻¹ of TNF- α .

4.4. Oxidative stress of murine macrophages after exposure to MWCNT

Acute oxidative stress was determined by measuring the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) by the OxiSelect[™] Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs). Briefly, the cells were seeded at 2×10^6 cells/well and allowed to adhere in a black 96 well plate for 4 h. A 1 h pre-treatment with the cell-permeant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF-DA) was carried out before a 90 min exposure to the MWCNT. The fluorescence intensities were read at 480 nm excitation and 530 nm emission (Fluoroskan Ascent, Thermo scientific). A positive control with cells exposed to 1 mM H₂O₂ was added. Biases were found to result from the fluorescence absorption by the black MWCNT. Results were thus corrected by the mean of acellular standard curves. They were traced after the variation of the fluorescent intensity of known concentrations of DCF probe (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) in complemented medium with and without MWCNT. Corrections were calculated for each CNT type and each dose (Supplementary data **Figure S2** and **Table S1**).

4.5. Statistical analysis

Results were expressed as the mean of three independent experiments, each carried out in triplicates, with standard errors of the mean value. Statistical significance was declared when $p < 0.05$ using a Student test with Tanagra software³⁸.

RESULTS

1. Physicochemical features

1.1. Morphology and specific surface area of the MWCNT

A thorough characterization of the nanomaterials is crucial. FEG-SEM images are presented in **Figure 1**. The morphology of the MWCNT remained alike after heating over 2100°C, presenting entangled tubes with no or very few traces of amorphous carbon. As shown in **Table 1** where all physicochemical features are summarized, the mean diameter was not impacted, neither was the diameter distribution (see Supplementary Data **Figure S3**). The results were confirmed by HR-TEM measurements: 17 ± 5 nm for CNT by SEM and HR-TEM, 17 ± 5 nm and 18 ± 4 nm for CNTa by SEM and HR-TEM respectively (**Figure 2**). While the measured mean diameter is almost twice the diameter given by the producer, the entanglement of the tubes unfortunately did not allow to confirm the given length of 1.5 μm . No significant change due to the thermal annealing area was detected in the specific surface area.

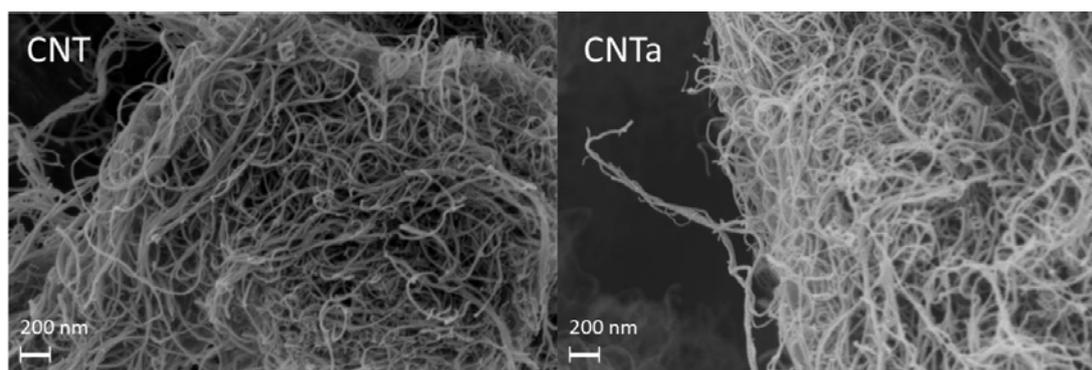


Figure 1: FEG-SEM images of multi-walled carbon nanotubes: as-produced (CNT) and after an annealing treatment at 2125°C under Ar (CNTa).

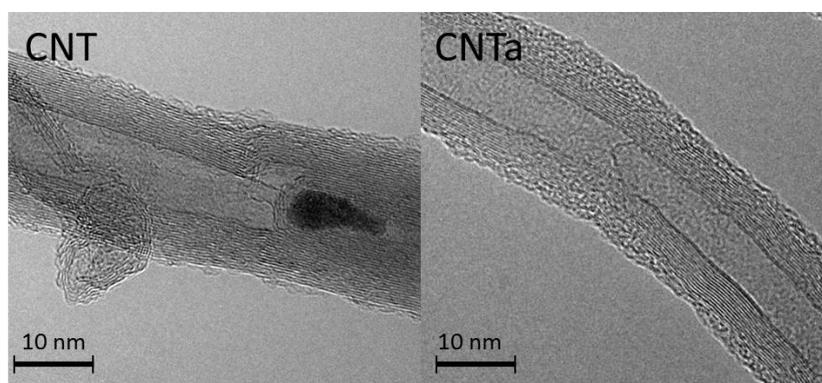


Figure 2: HR-TEM images of multi-walled carbon nanotubes: as-produced (CNT) and after an annealing treatment at 2125°C under Ar (CNTa).

Table 1: Physicochemical characteristics of the two carbon nanotubes ^A

Sample	CNT	CNTa
Diameter (nm)	17 ± 5	17 ± 5
Structural disorder (Id/Ig)	1.18 ± 0.10	0.77 ± 0.13
SSA (m ² .g ⁻¹)	212 ± 3	209 ± 3
Catalytic impurities (wt.%)	Fe 0.19 Al 4.23 Co 0.12	Fe 0.01 Al 0.00 Co 0.00
O (atomic proportion %)	8.7	3.5
Zeta potential in water (mV)	-23.3 ± 7.0	-36.4 ± 4.3
Zeta potential in culture medium (mV)	-127.0 ± 8.6	-156.0 ± 6.6

A: CNT: as-produced MWCNT, CNTa: MWCNT annealed at 2125°C under Ar. Mean diameters were determined by FEG-SEM observations and confirmed by HR-MET. Id/Ig corresponds to the intensity ratio of the Raman D and G-bands. SSA: specific surface area, measured according to Brunauer Emmett and Teller protocol. Catalytic impurity level was assessed by ICP-AES, levels <0.01 wt.% were found for Cu, Cr, Ni, and Ti. O/C atomic proportion is the intensity ratio of the O_{1s} and C_{1s} XPS peaks.

1.2. Lattice defects of the MWCNT

Raman spectroscopy was used to assess the lattice defects of the two MWCNT. The spectra exhibited the two typical bands of carbon material: the D-band (1340 cm⁻¹) and the G-band (1575 cm⁻¹), with two overtone peaks: the D'-band (2685 cm⁻¹) and the G'-band (2930 cm⁻¹) (**Figure 2** is an illustration of one Raman measurement). The Id/Ig ratio was significantly lowered by the annealing treatment from 1.24 to 0.77 which notifies of a higher crystallinity degree without a complete disappearance of the structural defects however. X-ray diffraction (XRD) was performed to further analyze the crystallinity of the samples. No change was however detectable between the two XRD diffraction patterns (see Supplementary Data **Figure S4** and **S5**).

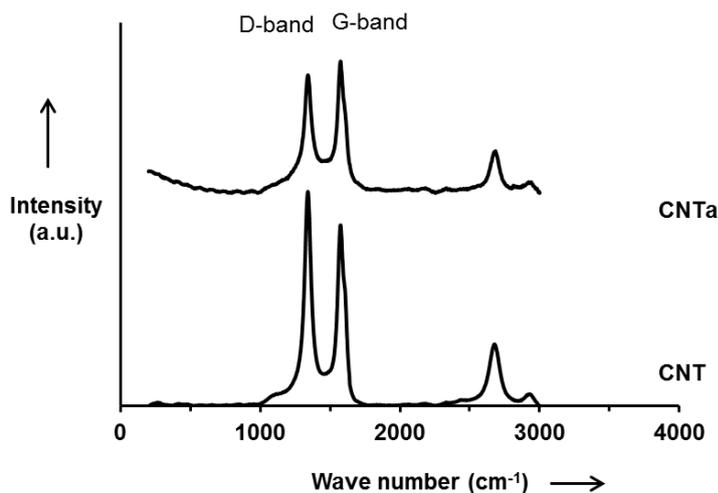


Figure 2: Raman spectra of carbon nanotubes: as-produced (CNT) and after an annealing treatment at 2125°C under Ar (CNTa).

1.3. Purification after annealing treatment of CNTa

As expected, the high temperature treatment removed the metallic impurities. It was confirmed by ICP-AES that all traces of Fe, Al and Co disappeared (**Table 1**). Al was the main catalyst used to produce those MWCNT and its level fell from 4.23 wt.% to an undetectable value (<0.01 wt.%).

1.4. Chemical modifications after annealing treatment of CNTa

The surface oxygen content was assessed by XPS analysis. First, general XPS spectra were analyzed for both samples (supplementary data **Figure S6**). Three main peaks were identified: the C_{1s} peak at 284.5 eV, the O_{1s} peak at 533 eV, and the Au_{4f} peaks from the substrate at 84 and 87.5 eV. The absence of contribution from the SiO₂ substrate (no signal from the Si_{2p} peak) was verified. A more detailed spectrum was recorded for each of the four peaks. The O/C atomic proportions (in percentage) are given in **Table 1**. The amount of oxygen decreased after the annealing treatment. The heating has probably desorbed and decomposed the oxygen-containing groups which were present at the nanotubes surface. Further assessment of the surface chemistry was conducted by the analysis of Zeta potentials and TDS. TDS results showed a decrease in oxygenated groups due to physisorption (in the 0-200°C range) and chemisorption (in the 400-600°C range) (**Figure 3**). CO₂ and H₂O desorptions confirmed this result (see Supplementary Data **Figures S7** and **S8**). Zeta potentials in deionized water and culture medium are presented in **Table 1**. The observed decrease in zeta potential in water is surprising. The pH of the suspensions were close enough (4.9 ± 0.6 and 4.8 ± 0.1) so that the difference should not contribute to the difference in zeta potentials. On the other hands,

suspensions in buffered culture medium were stable. Zeta potentials were very low, but the zeta potential of this culture medium alone (complemented DMEM) was already $-100 \text{ mV} \pm 12$. The difference in zeta potentials in culture medium could be due to the difference of the profile of the proteins at the CNT surface.

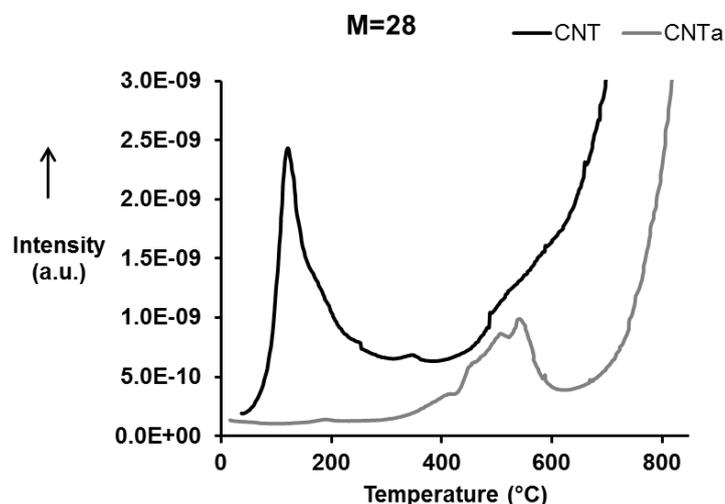


Figure 3: Thermal desorption of carbon nanotubes, following the M=28 related to CO. CNT: MWCNT as-produced, CNTa: MWCNT after an annealing treatment at 2125°C under Ar

2. Biological toxicity assessed in murine macrophages

In vitro assessment of the biological response to CNT and CNTa was conducted with a murine macrophage cell line (RAW 264.7). Cells were incubated for 90 min to 24 h with concentrations ranging from 15 to $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Interaction of the MWCNT and the macrophages were confirmed by microscopic observations (Supplementary Data **Figure S9**). These pictures allow to assess the final size of CNT and CNTa agglomerates in culture medium. CNT tended to exhibit less and smaller agglomerates than CNTa: average of $2.2 \mu\text{m} \pm 0.7$ for CNT and $3.5 \mu\text{m} \pm 1.9$ for CNTa (which some of the agglomerates as big as $10 \mu\text{m}$).

2.1. Cytotoxicity of RAW macrophages after exposure to MWCNT

LDH released from cells with damaged membranes, if significantly higher than the negative controls, is an indicator of cytotoxicity. For both MWCNT, a significant LDH release was uniquely observed at the maximum dose of $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Figure 4**). No significant difference was found between the cytotoxicity induced by CNT or CNTa.

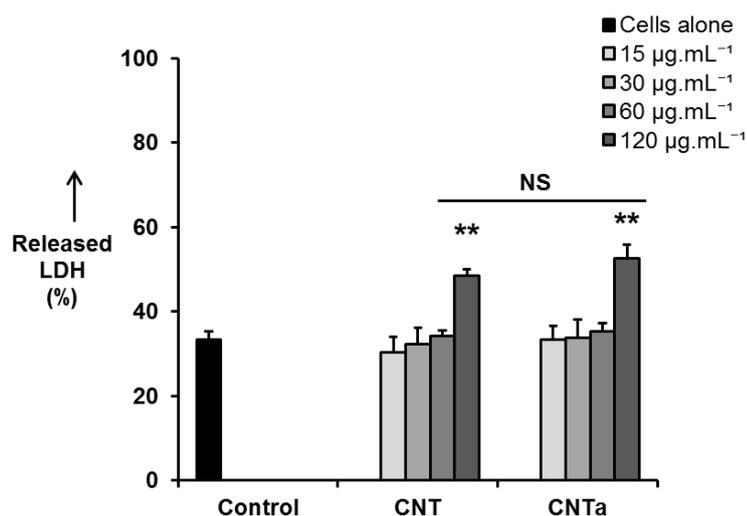


Figure 4: Cytotoxicity induced by a 24 h exposure to MWCNT as prepared (CNT) and annealed at 2125°C (CNTa). Significantly different from negative control ** $p < 0.001$, NS: not significantly different between CNT and CNTa.

2.2. Pro-inflammatory response of RAW macrophages after exposure to MWCNT

TNF- α is one of the cytokines indicators of the pro-inflammatory response for macrophage cells. The annealing treatment seemed to significantly increase the TNF- α production (Figure 5). It was found significant only at the highest concentration of CNT, while the levels were significant from 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of CNTa with a dose-dependent response.

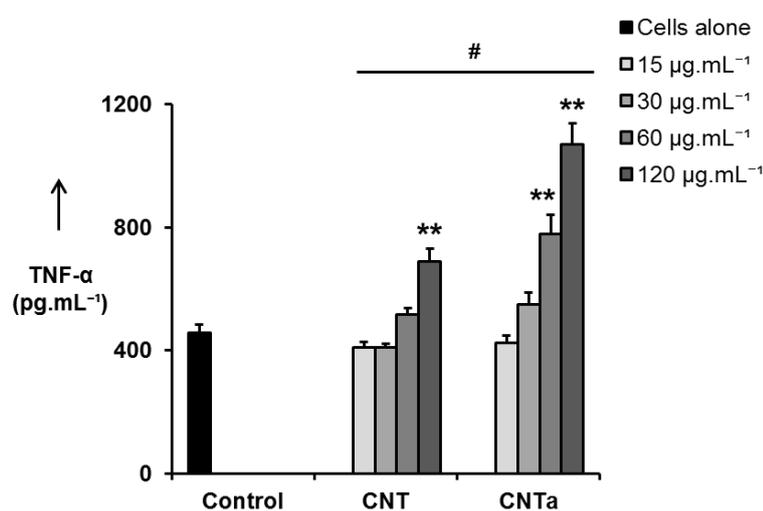


Figure 5: Pro-inflammatory response of macrophages after a 24 h contact with as-produced MWCNT (CNT) and annealed at 2125°C MWCNT (CNTa). Significantly different from the negative control ** $p < 0.001$, # significantly different between CNT and CNTa, $p < 0.01$ at 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, $p < 0.001$ at 60 and 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and not significantly different at 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.3. Oxidative stress of RAW macrophages after exposure to MWCNT

Measurement of ROS production demonstrated a significant high dose-response for both MWCNT, sign of a high oxidative stress (**Figure 6**). No significant difference was observed after the annealing treatment. The levels were already significant before corrections of the bias induced by the CNT absorption of fluorescence (at comparable levels with the positive control). After correction, the response was magnified with ROS levels reaching three times the level of the positive control.

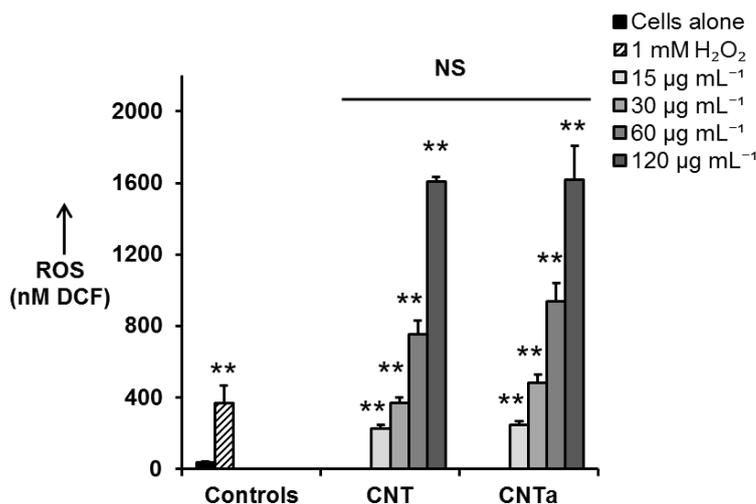


Figure 6: Reactive oxygen species (ROS) production by murine macrophages after a 90 min exposure to MWCNT as-produced (CNT) and annealed at 2125°C (CNTa) after correction of fluorescent decrease by MWCNT. Significantly different from negative control ** p < 0.001, NS: no significant difference between CNT and CNTa.

DISCUSSION

1. Impacts of the thermal annealing on the physicochemical features

This study was designed to assess the impact of the lattice defects and catalytic impurities on the macrophage response. First, the physicochemical features were evaluated before and after a high thermal treatment. The measured mean diameters were found to be two times higher than the value from the producer. Detecting the diameter of CNT bundles rather than isolated CNT could modify the measurement³⁹. However, the measurements from HR-TEM allowed a better precision for selecting isolated CNT and still confirmed the mean diameter. We were not able to measure the CNT length, but according to Yamamoto et al.¹⁸ if an annealing treatment could slightly reduce the CNT diameter, no impact was detected on the length. While no change was induced neither in the diameter and diameter distribution, nor on the specific surface area; the amount of lattice defects and catalytic impurities were decreased by heating over 2100°C, as

shown by Raman spectroscopy, ICP-AES and HR-TEM. Our ICP-AES data showed a the removal of the 4.5 wt.% metallic impurities, so the change in specific area should be 0.05% but the difference is not big enough to be detected by B.E.T. Chen et al.¹⁶ were able to observe some differences in the X-ray diffraction patterns before and after annealing, as the peaks were sharper and more defined. For a maximal temperature of 2000°C however, the differences in XRD patterns were minimal; they were more evident after annealing over 2200°C. In our study, the maximum temperature reached was 2125°C, which might explain why no change was seen in the XRD patterns. The crystalline lattice enhancement, thus the diminution of reactive sites was correlated to a decrease of oxygen-containing groups as revealed by the XPS and TDS. Moreover, metal oxides strongly bind hydrophilic groups. Therefore the purification from Al and Fe may also contribute to the decrease of oxygen-containing groups^{22, 40}. The level of oxygen-containing groups remained however still a relatively high content. This could be linked to the structural defects that still remained after annealing, favoring the adsorption of a thin layer of oxygen-containing groups with a passivation mechanism. The presence of this thin layer could explain why the zeta potential in water was lower after annealing, while the XPS and TDS measurement showed a lower content of oxygen-containing groups. Zeta potential is indeed a measurement of the very external charge of the CNT. Furthermore, the decrease of physisorbed water observed by TDS is also a clear indication that the annealing treatment increased the hydrophobicity of the CNTa. Microscopic observations are representative of the agglomeration trend. CNT tended to exhibit less and smaller agglomerates, which is coherent with the increase in hydrophobicity after annealing.

2. Impacts of the thermal annealing on the biological response

Concentrations of 15 to 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (3.75 to 30 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) were chosen within the range of commonly used doses^{20, 36}. Regarding potential human exposure, Vietti et al.⁴¹ considered these doses as pertinent even though overestimated. The overestimation counterbalances the short exposure, the irregular CNT distribution in lung, and the low deposition in vitro decreasing the effective dose in contact with the cells.

No effect of the annealing treatment was observed regarding LDH leakage. The cytotoxicity seemed thus not to be linked with the two principal physicochemical characteristics modified by the annealing treatment: the lattice defects and the metallic impurity content. This suggests that these two parameters have no direct influence on the loss of membrane integrity. These results were consistent with the study of Simon-Deckers et al.²⁰. Muller et al.²³ found on the contrary that the annealing treatment when carried out after a 6 h grinding step decreases the LDH leakage, compared to just grinded CNT. However, after a low thermal treatment at 600°C, the cytotoxicity was already decreased. The observed difference may thus not result from the purification and structural enhancement. Moreover, the study design was radically different. This was an in vivo study with 2 mg of MWCNT administered intratracheally to

Wistar rat. The LDH assay was realized on the bronchoalveolar lavage supernatant recovered 3 days after exposure, so the results are not comparable to our study.

An increase in TNF- α production was detected after the annealing treatment. The purification and reduction of structural defects did not have any protective effect to the pro-inflammatory response. On the contrary, a decrease in structural defects may increase the inflammation through the increase of hydrophobicity or the modification of the protein corona at the CNT surface. Fenoglio et al.²² acknowledged a relationship between structural defects and water interaction, with an increase of the hydrophobicity after annealing. It was suggested here by the TDS and XPS that the annealing treatment increased the hydrophobicity and decreased the level of surface oxygen-containing groups. First, this seemed to have an impact on the size of the agglomerates, secondly it can influence the corona layer. In their work, Lynch and Dawson⁴² described the corona model: a layer of biomolecules, mainly proteins, adsorbed to the nanoparticle surface in a dynamic equilibrium. In the context of cell culture, this corona should be composed by the culture medium proteins. Kapralov et al.⁴³ then Cai et al.⁴⁴ demonstrated the *in vivo* adsorption of surfactant lipids and proteins on CNT, confirming the presence of protein corona. The protein corona can influence the biological response as the object interacting with the cells is really the CNT and its adsorbed layer^{45,46}. Thermal structural enhancement could influence the protein corona either by a decrease of adsorption sites or by a modification of the nature and conformation of the adsorbed proteins. These changes in surface chemistry could explain potentially the increase in the pro-inflammatory response. Dutta et al.⁴⁷ showed that precoating single-walled CNT with a non-ionic surfactant inhibited albumin adsorption and the CNT anti-inflammatory properties. Therefore, it is possible that the impact of the annealing treatment on the pro-inflammatory response may be due to the change in surface chemistry.

Furthermore, Schinwald et al.⁴⁸ suggested in their study that the threshold length to induce frustrated phagocytosis is 5 μm in mice. In our work, the measured agglomerates have mean length under this threshold. No frustrated phagocytosis was observed here. However, the discussion about lattice defects and corona could also partly explain the higher inflammation caused by rigid CNT. It is thought to be due to the phenomena of frustrated phagocytosis where macrophages fail to fully engulf oversized CNT^{9,49}. Such rigid CNT triggering frustrated phagocytosis are highly crystallized. Thus the modification of the protective layer could have an additional role in the increase of the inflammation. Again, our results were not consistent with those of Muller et al.²³. The *in vitro* and *in vivo* inflammatory responses were found to be decreased after annealing of the grinded CNT. But again, the biological response was already reduced by half *in vivo* or to a non-significant level *in vitro* after a low thermal treatment. Thus, it can be suggested that the effect on the inflammation was not mainly due to structural enhancement or purification.

In the present work, it was first hypothesized that the main impact of high temperature annealing was the decrease in oxidative stress due to the purification from catalytic impurities. However, no decrease of the ROS production was observed after the annealing treatment. Our hypothesis was based on the relationship between metallic impurity content and oxidative stress. It has indeed been suggested that transition metal like Fe²⁶, and indirectly metals such as Al³¹ contribute to ROS generation. To explain the absence of decrease in ROS production after the CNT purification, a second mechanism has to be taken into account: the CNT scavenging capacity. CNT seem indeed to have the ability to quench rather than generate oxygenated free radicals. The origin of this mechanism is still under debate, however it has been shown to decrease after annealing due to the reduction of structural defects^{22, 24}. The same phenomenon has been observed concerning GSH: before annealing, carbon nanomaterials have the capacity to decrease the level of GSH in the medium^{33, 34}; after annealing, the level of GSH increased. The scavenging activity could mask the ROS production and decrease the oxidative stress. Thus, a balance between the reduction of catalytic impurities and the reduction of the scavenging activity could explain why no effect of the annealing treatment was detected regarding the oxidative stress. The CNT scavenging activity was not evaluated for this study, and to our knowledge, no other comparative study of the impact on CNT thermal annealing on the oxidative stress has been published. Therefore this remains a hypothesis. Besides, it has to be underlined, that even the purified CNTa enhanced a high ROS production. This implicate that CNT could trigger oxidative stress independently of metallic impurities. This capacity seems to be linked with the CNT/cell interaction and to be dependent from the CNT physicochemical properties. Tsukahara and Haniu³⁶ studied the ROS production in a human bronchial epithelium cell line after a 24 h exposure to 0.1 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of annealed MWCNT (2800°C) and found no significant response. They did not assess the catalytic impurities and structural defects, but very few amounts were expected. Thus, the absence of oxidative stress could not be due to the scavenging activity, but may be due to the MWCNT characteristics. Likely, in our latest study⁵⁰ the oxidative stress of annealed (2600°C) large MWCNT with high crystallinity and no distinguishable impurities was assessed and no response was found either. We thus suggest that the oxidative stress can be enhanced either by metallic impurities or by the simple presence of CNT, depending on the CNT physicochemical characteristics; and that the oxidative stress can be reduced by the scavenging activity due to the defects in crystalline lattice.

CONCLUSION

Metallic impurity and structural defects play an important role in CNT toxicity. In this study, high thermal treatment was used to purify the CNT and lower their level of crystalline defects. The annealing treatment showed no influence on the cytotoxicity and the oxidative stress, but revealed an increase of the pro-inflammatory response, although metallic impurities are supposed to enhance the oxidative stress. We suggest here that the impact of the purification is counterbalanced by the decrease of structural defects and of the related scavenging activity. The

change in hydrophobicity could moreover modify the nature, number and conformation of the proteins adsorbed at the CNT surface, and alters the protective layer against the pro-inflammatory process. Further research on the structural defects could help confirm these theories by exploring the relationship between the corona, the scavenging activity and the biological response. An annealing treatment did not seem the appropriate way to decrease the biological response for a safer by design approach.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dominique Goeuriot and Christophe Meunier from the center of structures and materials sciences (EMSE, St-Etienne) for their help regarding the annealing treatment.

ABBREVIATION LIST

- B.E.T.: Brunauer–Emmet–Teller method
- CNT: carbon nanotubes
- CNTa: annealed carbon nanotubes
- CVD: chemical vapor deposition
- DCF: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- FEG-SEM: field emission gun – scanning electron microscopy
- HR-TEM : high-resolution transmission electron microscopy
- H2DCF-DA: 2'7'-dichlorodihydrofluorescein
- LDH: lactate dehydrogenase
- MWCNT: multi-walled carbon nanotubes
- ROS: reactive oxygen species
- TDS: thermal desorption
- TNF- α : tumor necrosis factor α
- XPS: X-ray photoelectron spectroscopy
- XRD: X-ray diffraction

REFERENCES

- (1) Iijima, S. (1991) Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354, 56–58.
- (2) De Volder, M. F. L., Tawfick, S. H., Baughman, R. H., and Hart, A. J. (2013) Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications, *Science* 339, 535–539.
- (3) Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., and Heer, W. A. de. (2002) Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications, *Science* 297, 787–792.
- (4) Porter, D. W., Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Wu, N., Wolfarth, M. G., Sriram, K., Leonard, S., Battelli, L., Schwegler-Berry, D., Friend, S., Andrew, M., Chen, B. T., Tsuruoka, S., Endo, M., and Castranova, V. (2010) Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes, *Toxicology* 269, 136–147.
- (5) Shvedova, A. A., Kisin, E., Murray, A. R., Johnson, V. J., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B. T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, V., Baron, P. A., and Kagan, V. E. (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, L552–L565.
- (6) Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.-F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J. B., and Lison, D. (2005) Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 221–231.
- (7) Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Porter, D., Schulte, P., Kagan, V. E., Fadeel, B., and Castranova, V. (2009) Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus?, *Pharmacol. Ther.* 121, 192–204.
- (8) Fröhlich, E., Meindl, C., Höfler, A., Leitinger, G., and Roblegg, E. (2012) Combination of small size and carboxyl functionalisation causes cytotoxicity of short carbon nanotubes, *Nanotoxicology* 1–14.
- (9) Brown, D. M., Kinloch, I. A., Bangert, U., Windle, A. H., Walter, D. M., Walker, G. S., Scotchford, C. A., Donaldson, K., and Stone, V. (2007) An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis, *Carbon* 45, 1743–1756.
- (10) Schrurs, F., and Lison, D. (2012) Focusing the research effort, *Nat. Nanotechnol.* 7, 546–548.
- (11) Kayat, J., Gajbhiye, V., Tekade, R. K., and Jain, N. K. (2011) Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 7, 40–49.
- (12) Jiang, J., Oberdorster, G., and Biswas, P. (2009) Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J. Nanoparticle Res.* 11, 77–89.

- (13) Ebbesen, T. W., and Takada, T. (1995) Topological and SP3 defect structures in nanotubes, *Carbon* 33, 973–978.
- (14) Bougrine, A., Dupont-Pavlovsky, N., Naji, A., Ghanbaja, J., Marêché, J. F., and Billaud, D. (2001) Influence of high temperature treatments on single-walled carbon nanotubes structure, morphology and surface properties, *Carbon* 39, 685–695.
- (15) Boncel, S., and Koziol, K. K. K. (2014) Enhanced graphitization of c-CVD grown multi-wall carbon nanotube arrays assisted by removal of encapsulated iron-based phases under thermal treatment in argon, *Appl. Surf. Sci.* 301, 488–491.
- (16) Chen, J., Shan, J. Y., Tsukada, T., Munekane, F., Kuno, A., Matsuo, M., Hayashi, T., Kim, Y. A., and Endo, M. (2007) The structural evolution of thin multi-walled carbon nanotubes during isothermal annealing, *Carbon* 45, 274–280.
- (17) Fiorito, S., Monthieux, M., Psaila, R., Pierimarchi, P., Zonfrillo, M., D’Emilia, E., Grimaldi, S., Lisi, A., Béguin, F., Almairac, R., Noé, L., and Serafino, A. (2009) Evidence for electro-chemical interactions between multi-walled carbon nanotubes and human macrophages, *Carbon* 47, 2789–2804.
- (18) Yamamoto, G., Shirasu, K., Nozaka, Y., Sato, Y., Takagi, T., and Hashida, T. (2013) Structure-property relationships in thermally-annealed multi-walled carbon nanotubes, *Carbon*.
- (19) Pinault, M., Mayne-L’Hermite, M., Reynaud, C., Beyssac, O., Rouzaud, J. N., and Clinard, C. (2004) Carbon nanotubes produced by aerosol pyrolysis: growth mechanisms and post-annealing effects, *Diam. Relat. Mater.* 13, 1266–1269.
- (20) Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L’Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., and Carrière, M. (2008) In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes, *Toxicology* 253, 137–146.
- (21) Cheng, C., Müller, K. H., Koziol, K. K. K., Skepper, J. N., Midgley, P. A., Welland, M. E., and Porter, A. E. (2009) Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells, *Biomaterials* 30, 4152–4160.
- (22) Fenoglio, I., Greco, G., Tornatis, M., Muller, J., Rayrundo-Pinero, E., Beguin, F., Fonseca, A., Nagy, J. B., Lison, D., and Fubini, B. (2008) Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: Physicochemical aspects, *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1690–1697.
- (23) Muller, J., Huaux, F., Fonseca, A., Nagy, J. B., Moreau, N., Delos, M., Raymundo-Pinero, E., Beguin, F., Kirsch-Volders, M., Fenoglio, I., Fubini, B., and Lison, D. (2008) Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: toxicological aspects, *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1698–1705.

- (24) Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J. B., and Fubini, B. (2006) Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity?, *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1227–1233.
- (25) Galano, A., Francisco-Marquez, M., and Martinez, A. (2010) Influence of Point Defects on the Free-Radical Scavenging Capability of Single-Walled Carbon Nanotubes, *J. Phys. Chem. C* 114, 8302–8308.
- (26) Ge, C., Li, Y., Yin, J.-J., Liu, Y., Wang, L., Zhao, Y., and Chen, C. (2012) The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials, *NPG Asia Mater.* 4, e32.
- (27) Kagan, V. E., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Konduru, N. V., Potapovich, A. I., Osipov, A. N., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Mercer, R., Castranova, V., and Shvedova, A. A. (2006) Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron, *Toxicol. Lett.* 165, 88–100.
- (28) Shvedova, A. A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., and Kagan, V. E. (2012) Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 261, 121–133.
- (29) Bussy, C., Pinault, M., Cambedouzou, J., Landry, M. J., Jegou, P., Mayne-L'hermite, M., Launois, P., Boczkowski, J., and Lanone, S. (2012) Critical role of surface chemical modifications induced by length shortening on multi-walled carbon nanotubes-induced toxicity, *Part. Fibre Toxicol.* 9, 46.
- (30) Mahdi, A. A., Tripathi, S., Neerja, J., and Hasan, M. (2010) Aluminium Mediated Oxidative Stress: Possible Relationship to Cognitive Impairment of Alzheimer's Type, *Ann. Neurosci.* 13, 18–24.
- (31) Ruipérez, F., Mujika, J. I., Ugalde, J. M., Exley, C., and Lopez, X. (2012) Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II), *J. Inorg. Biochem.* 117, 118–123.
- (32) Exley, C. (2004) The pro-oxidant activity of aluminum, *Free Radic. Biol. Med.* 36, 380–387.
- (33) Zhang, X., Zhu, Y., Li, J., Zhu, Z., Li, J., Li, W., and Huang, Q. (2011) Tuning the cellular uptake and cytotoxicity of carbon nanotubes by surface hydroxylation, *J. Nanoparticle Res.* 13, 6941–6952.
- (34) Liu, X., Sen, S., Liu, J., Kulaots, I., Geohegan, D., Kane, A., Puretzky, A. A., Rouleau, C. M., More, K. L., Palmore, G. T. R., and Hurt, R. H. (2011) Antioxidant Deactivation on Graphenic Nanocarbon Surfaces, *Small* 7, 2775–2785.
- (35) Hirano, S., Kanno, S., and Furuyama, A. (2008) Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 244–251.

- (36) Tsukahara, T., and Haniu, H. (2011) Cellular cytotoxic response induced by highly purified multi-wall carbon nanotube in human lung cells, *Mol. Cell. Biochem.* 352, 57–63.
- (37) Belin, T., and Epron, F. (2005) Characterization methods of carbon nanotubes: a review, *Mater. Sci. Eng. B-Solid State Mater. Adv. Technol.* 119, 105–118.
- (38) Rakotomalala, R. (2005) TANAGRA : un logiciel gratuit pour l'enseignement et la recherche. In *RNTI-E-3*, pp 697–702.
- (39) Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsá, R. R., and Rousset, A. (2001) Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes, *Carbon* 39, 507–514.
- (40) Fubini, B., Zanetti, G., Altilia, S., Tiozzo, R., Lison, D., and Saffiotti, U. (1999) Relationship between surface properties and cellular responses to crystalline silica: Studies with heat-treated cristobalite, *Chem. Res. Toxicol.* 12, 737–745.
- (41) Vietti, G., Ibouaraadaten, S., Palmái-Pallag, M., Yakoub, Y., Bailly, C., Fenoglio, I., Marbaix, E., Lison, D., and van den Brule, S. (2013) Towards predicting the lung fibrogenic activity of nanomaterials: experimental validation of an in vitro fibroblast proliferation assay, *Part. Fibre Toxicol.* 10, 52–52.
- (42) Lynch, I., and Dawson, K. A. (2008) Protein-nanoparticle interactions, *Nano Today* 3, 40–47.
- (43) Kapralov, A. A., Feng, W. H., Amoscato, A. A., Yanamala, N., Balasubramanian, K., Winnica, D. E., Kisin, E. R., Kotchey, G. P., Gou, P., Sparvero, L. J., Ray, P., Mallampalli, R. K., Klein-Seetharaman, J., Fadeel, B., Star, A., Shvedova, A. A., and Kagan, V. E. (2012) Adsorption of Surfactant Lipids by Single-Walled Carbon Nanotubes in Mouse Lung upon Pharyngeal Aspiration, *ACS Nano* 6, 4147–4156.
- (44) Cai, X., Ramalingam, R., Wong, H. S., Cheng, J., Ajuh, P., Cheng, S. H., and Lam, Y. W. (2013) Characterization of carbon nanotube protein corona by using quantitative proteomics, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 9, 583–593.
- (45) Mao, H., Chen, W., Laurent, S., Thirifays, C., Burtea, C., Rezaee, F., and Mahmoudi, M. (2013) Hard corona composition and cellular toxicities of the graphene sheets, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 109, 212–218.
- (46) Lanone, S., Andujar, P., Kermanizadeh, A., and Boczkowski, J. (2013) Determinants of carbon nanotube toxicity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 2063–2069.
- (47) Dutta, D., Sundaram, S. K., Teegarden, J. G., Riley, B. J., Fifield, L. S., Jacobs, J. M., Addleman, S. R., Kaysen, G. A., Moudgil, B. M., and Weber, T. J. (2007) Adsorbed Proteins Influence the Biological Activity and Molecular Targeting of Nanomaterials, *Toxicol. Sci.* 100, 303–315.

(48) Schinwald, A., Murphy, F. A., Prina-Mello, A., Poland, C. A., Byrne, F., Movia, D., Glass, J. R., Dickerson, J. C., Schultz, D. A., Jeffree, C. E., MacNee, W., and Donaldson, K. (2012) The Threshold Length for Fiber-Induced Acute Pleural Inflammation: Shedding Light on the Early Events in Asbestos-Induced Mesothelioma, *Toxicol. Sci.* 128, 461–470.

(49) Nagai, H., Okazaki, Y., Chew, S. H., Misawa, N., Yamashita, Y., Akatsuka, S., Ishihara, T., Yamashita, K., Yoshikawa, Y., Yasui, H., Jiang, L., Ohara, H., Takahashi, T., Ichihara, G., Kostarelos, K., Miyata, Y., Shinohara, H., and Toyokuni, S. (2011) Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E1330–E1338.

(50) Figarol, A., Pourchez, J., Boudard, D., Forest, V., Tulliani, J.-M., Lecompte, J.-P., Cottier, M., Bernache-Assollant, D., and Grosseau, P. (2014) Biological response to purification and acid functionalization of carbon nanotubes, *J. Nanoparticle Res.* 16, 1–12.

II.2. Supplementary data

THERMAL ANNEALING OF CARBON NANOTUBES REVEALS A STRONG TOXICOLOGICAL IMPACT OF THE STRUCTURAL DEFECTS

Agathe Figarol ^{† ‡ *}, Jérémie Pourchez ^{‡ *}, Delphine Boudard [#], Valérie Forest [‡], Sarah Berhanu [€], Jean-Marc Tulliani ^β, Jean-Pierre Lecompte [□], Michèle Cottier [#], Didier Bernache-Assollant [‡], Philippe Grosseau [†]

[†] Ecole Nationale Supérieure des Mines, SPIN-EMSE, CNRS: UMR 5307, LGF, F-42023 Saint-Etienne (France), [‡] Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, EA 4624, SFR IFRESIS, LINA, F-42023 Saint-Etienne (France), [#] Université Jean Monnet Saint-Etienne, EA 4624, SFR IFRESIS, LINA, F-42023 Saint-Etienne (France), [€] Armines - Mines ParisTech, Centre des Matériaux, CNRS UMR 7633, F-91003 Evry (France), ^β Politecnico di Torino, Department of Applied Science and Technology, 10129 Torino (Italy), [□] SPCTS, Centre Européen de la céramique CNRS: UMR 7315, F-87068 Limoges, (France).

* Correspondence to: figarol@emse.fr or pourchez@emse.fr

1. Thermal desorption

Thermal desorption allows a detection of the elements thermally desorbed from a sample (**Figure S1**). The volatilized elements are analyzed by a mass spectrophotometer. The obtained graphs show the intensity variation depending on the temperature for a set molecular mass.

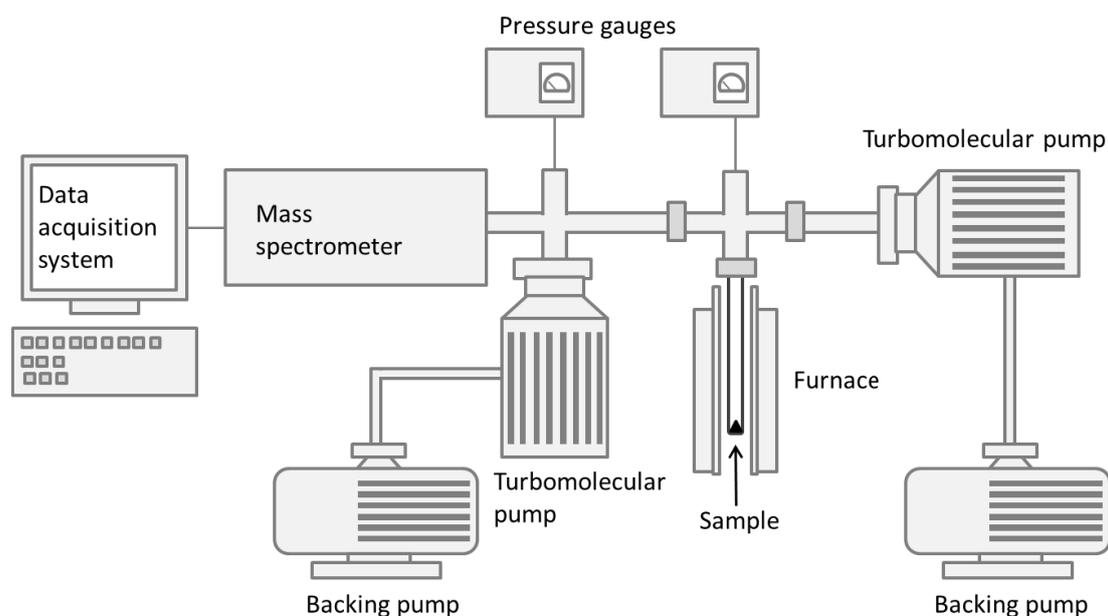


Figure S1: Thermal desorption device

2. Corrections of the ROS assay

An experiment was carried out to evaluate the biases induced by the MWCNT and due to fluorescence absorption. A standard curve of the fluorescent probe DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) with concentrations of 0, 10, 100, 1000 nM was realized in complemented culture medium without any cells. The same experiment was conducted with CNT or CNTa at concentrations of 15, 30, 60, and 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The difference between the fluorescence without and with MWCNT was calculated for each MWCNT sample. **Figure S2** shows an example of the obtained correction curves, and **Table S1** sum up the correction law for each MWCNT sample. This law was the applied to the data from the ROS (reactive oxygen species) assay to obtained corrected values.

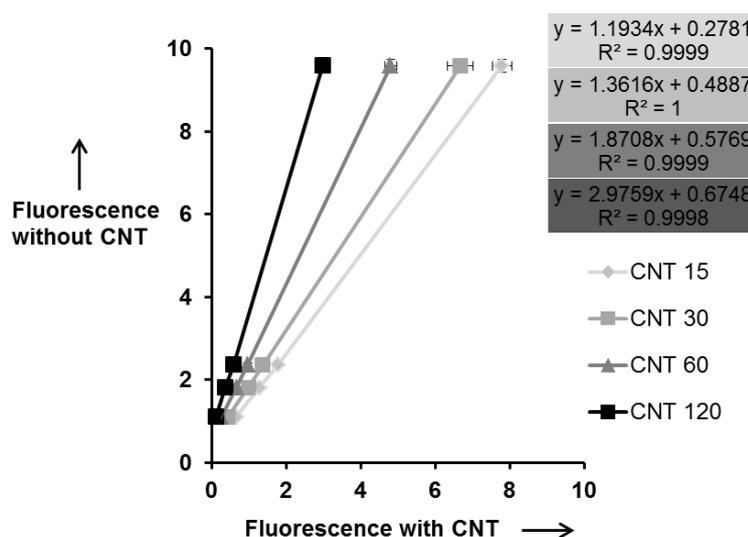


Figure S2: Example of the correction curves of DCF with and without CNT

Table S1: Correction laws for each sample of CNT and CNTa used for the ROS assay (repeated n=3)

Powder	Correction at 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
CNT n°1	$y = 1.19x + 0.28$	$y = 1.36x + 0.49$	$y = 1.87x + 0.58$	$y = 2.98x + 0.67$
CNT n°2	$y = 1.26x + 0.25$	$y = 1.49x + 0.41$	$y = 1.96x + 0.54$	$y = 3.14x + 0.65$
CNT n°3	$y = 1.29x + 0.44$	$y = 1.50x + 0.64$	$y = 2.17x + 0.74$	$y = 3.47x + 0.86$
CNTa n°1	$y = 1.24x + 0.24$	$y = 1.38x + 0.47$	$y = 1.78x + 0.62$	$y = 2.60x + 0.78$
CNTa n°2	$y = 1.17x + 0.27$	$y = 1.29x + 0.445$	$y = 1.63x + 0.61$	$y = 2.30x + 0.74$
CNTa n°3	$y = 1.31x + 0.32$	$y = 1.36x + 0.61$	$y = 1.68x + 0.79$	$y = 2.39x + 0.97$

3. Diameter distribution

The diameters from the 300 measurements conducted on the FEG-SEM images are presented as a distribution in number in **Figure S3**. No major difference could be detected between both diameter distributions.

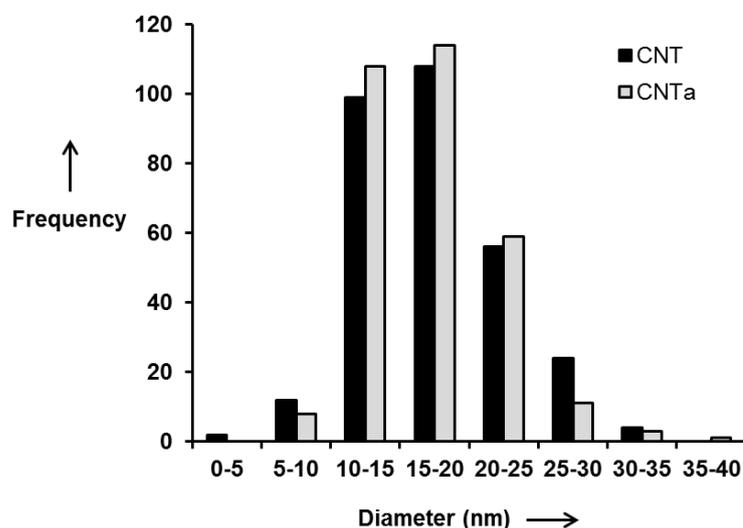


Figure S3: Distribution of the MWCNT diameters, CNT: as-produced, CNTa: annealed at 2125°C 1h under Ar.

4. X-ray diffraction

An X-ray diffractometer (D5000 Siemens) was used to assess the crystallinity of the MWCNT powders. A Cu K α X-ray source was used. **Figure S4** and **Figure S5** show the XRD spectra of the pristine CNT and the annealed CNTa. A high background noise was detected for both samples, meaning that the crystallinity was poor even after annealing.

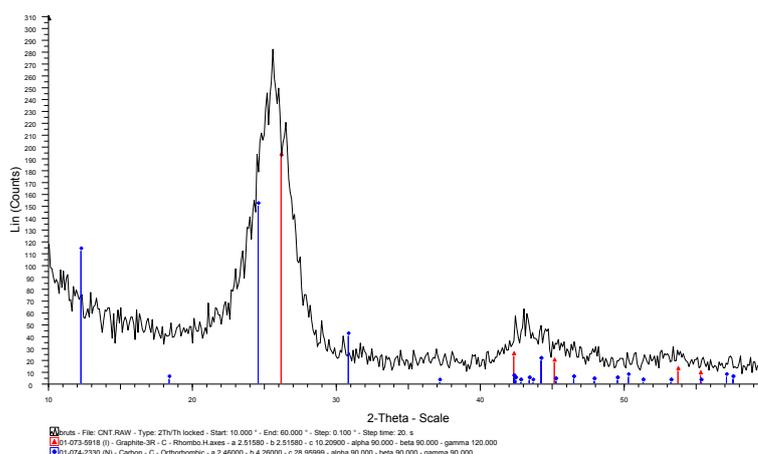


Figure S4: XRD spectrum of the as-produced MWCNT (CNT)

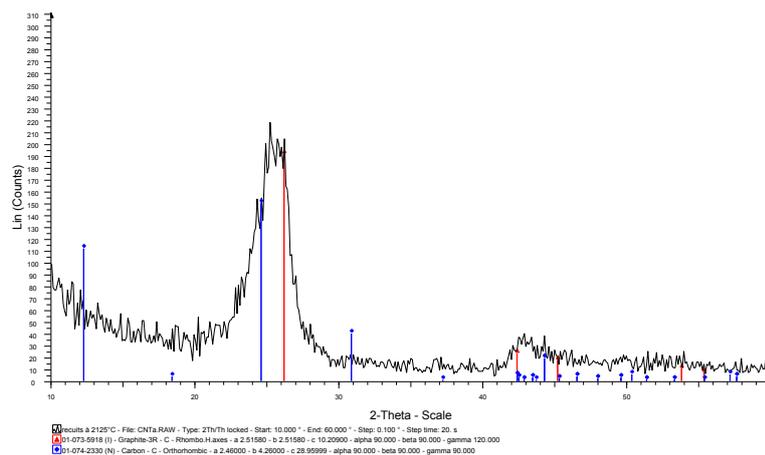


Figure S5: XRD spectrum of the annealed MWCNT (CNTa)

5. Chemical modifications by thermal annealing

The chemical properties of the CNT and CNTa were assessed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (**Figure S6**).

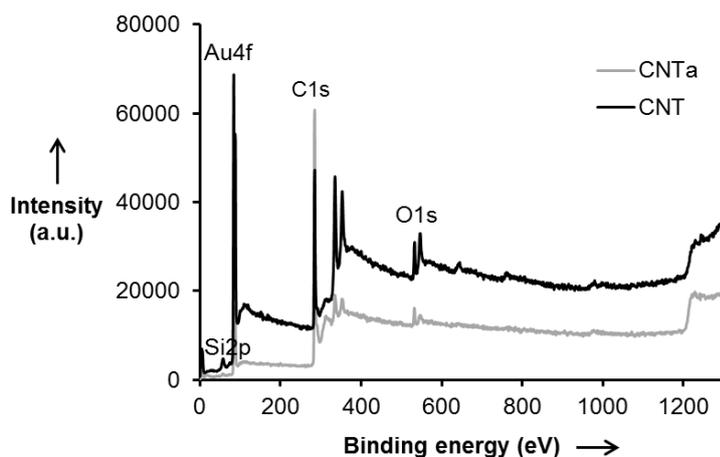


Figure S6: XPS spectra of the pristine CNT and annealed CNTa.

Furthermore, it was possible to identify a decrease in oxygenated groups by thermal desorption. In the main text, the **Figure 3** shows a different behavior regarding the desorption of CO. In **Figure S7** and **Figure S8** are presented the thermal desorption of H₂O and CO₂. These graphs show strong releases of CO for both materials, CO₂ and H₂O for CNTa at high temperatures (over 700°C). They are believed to come from the degradation of the nanotubes. The vacuum may be not high enough and no Argon is added (contrarily as for the annealing treatment) to prevent it from happening.

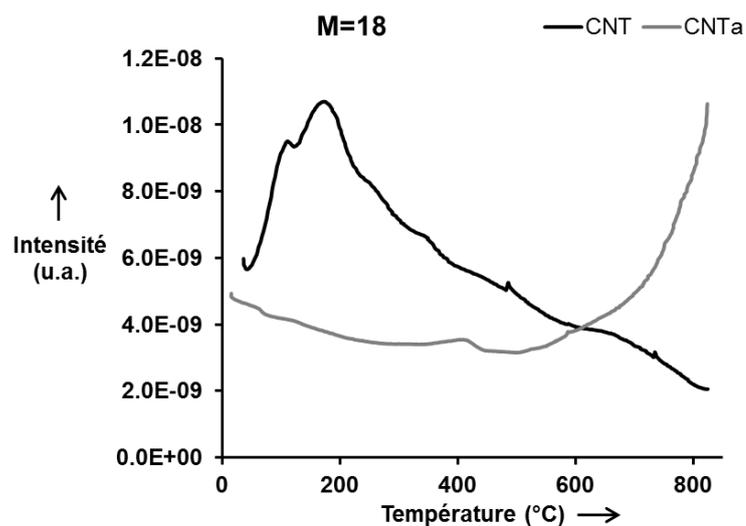


Figure S7: Thermal desorption of carbon nanotubes, following the M=18 related to H₂O

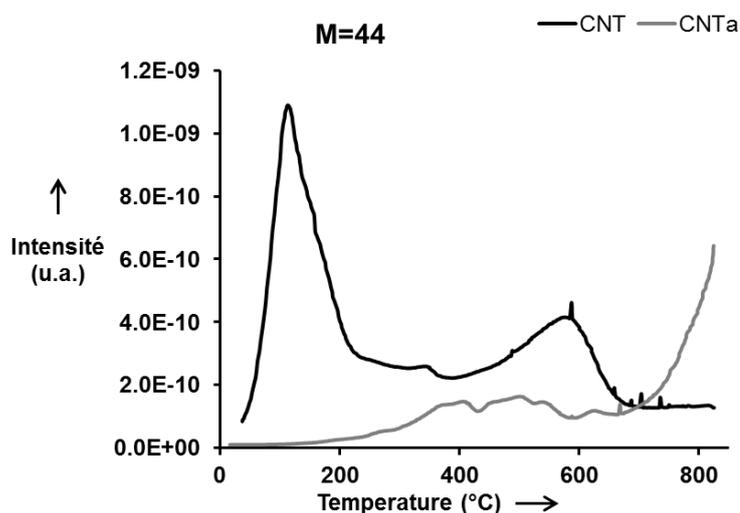


Figure S8: Thermal desorption of carbon nanotubes, following the M=44 related to CO₂

6. Microscopic observations

Microscopic observations have been conducted after a 24 h exposition of the murine macrophages to 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CNT or CNTa. Cells were seeded directly with the MWCNT on an 8-well chambered coverglass (Lab-Tek[®]) at a concentration of 25,000 cells/well. After 24 h, the cells were then rinsed twice with PBS, dried and kept at -20°C before a May-Grünwald Giemsa staining (MGG) (**Figure S9**).

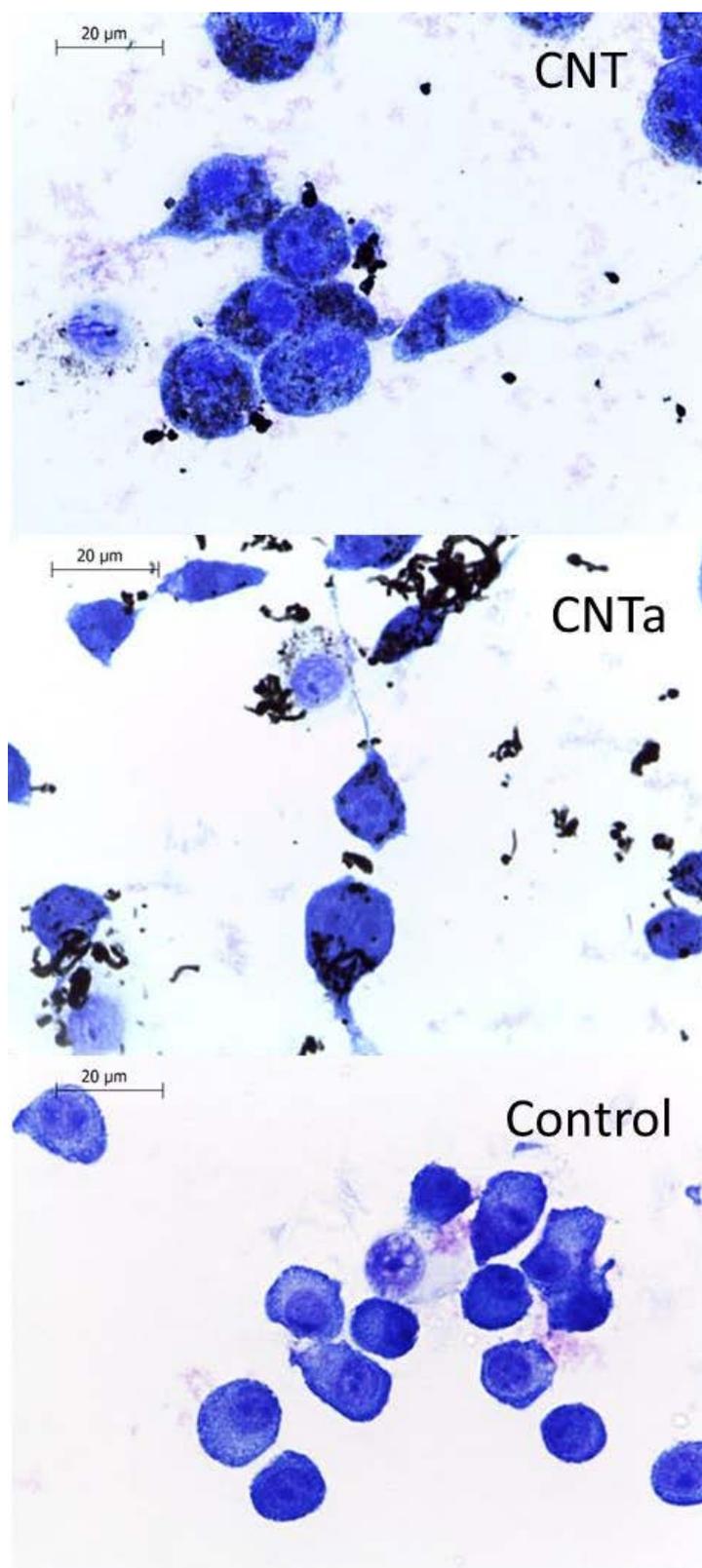


Figure S9: Microscopic observations of RAW 264.7 macrophages exposed for 24h to $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of CNT or CNTa or culture medium only, May-Grünwald Giemsa staining.

III. Données complémentaires

Les deux premiers essais de recuit haute température des CNT à 2000°C ont entraîné une plus faible amélioration de la structure cristalline que le traitement à 2125°C. Pour autant, les réponses biologiques entraînées par les différents CNT recuits ne différaient que très peu.

Comme pour les CNT recuits 1 h à 2125°C (CNTa), les CNT recuits 2 h ou 3 h à 2000°C (CNT2 et CNT3 respectivement) ne présentaient pas de différence de morphologie avec les CNT bruts observables sur des images obtenues par FEG-MEB (**Figure 40**).

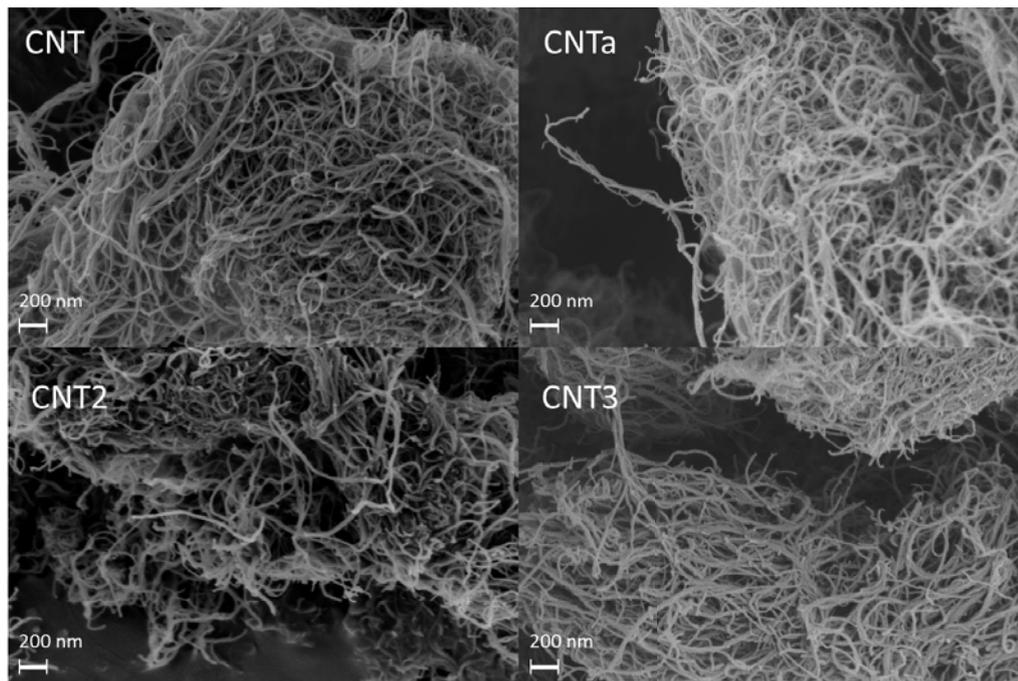


Figure 40 : Images de microscopie électronique à balayage (FEG-SEM) de nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3).

Les diamètres mesurés sur les images FEG-MEB étaient équivalents pour tous les CNT (**Tableau 7**). Les surfaces spécifiques (SSA) étaient elles aussi très proches entre les 4 CNT, les différences pouvant être dues aux incertitudes de la technique B.E.T. Les taux I_d/I_g calculés à partir des spectres Raman (**Figure 41**) indiquaient une diminution du désordre structurel après recuit (**Tableau 7**). Rallonger le temps de traitement à 2000°C a permis de diminuer le taux de défauts de structure. Cependant, la diminution était plus importante après 1 h seulement de traitement à plus haute température (2125°C). Cela rejoint les conclusions de Chen et al. (2007) qui indiquaient que la température de recuit a une plus forte influence sur l'amélioration de la cristallisation que la durée du traitement. Quelques soient les caractéristiques du recuit en revanche, les impuretés métalliques ont été éliminées. Les potentiels zêta des 4 CNT étaient très proches, mais une légère augmentation des points isoélectriques était détectable pour les CNT3

et les CNTa. Cela indique qu'il n'y a, *a priori*, pas eu de phénomène d'oxydation des poudres lors du traitement thermique, mais que l'hydrophobicité des CNT3 et CNTa semble avoir été augmentée.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques de nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3).

Echantillon	CNT	CNTa	CNT2	CNT3
Diamètre (nm)	17 ± 5	17 ± 5	17 ± 5	18 ± 4
Désordre structurel (Id/Ig)	1,24	0,77	1,01	0,98
SSA (m ² .g ⁻¹)	212 ± 3	209 ± 3	203 ± 3	211 ± 3
Impuretés catalytiques (%m.)	Fe 0,19	0,01	0,01	0,01
	Al 4,23	0,00	0,00	0,01
	Co 0,12	0,00	0,00	0,00
Potentiel zêta dans l'eau MQ (mV)	-22,6 ± 8,0	-36,4 ± 4,32	-30,8 ± 7,40	-26,2 ± 3,69
Point isoélectrique (pH)	2,79 ± 0,06	2,82 ± 0,02	2,60 ± 0,20	3,2 ± 0,10

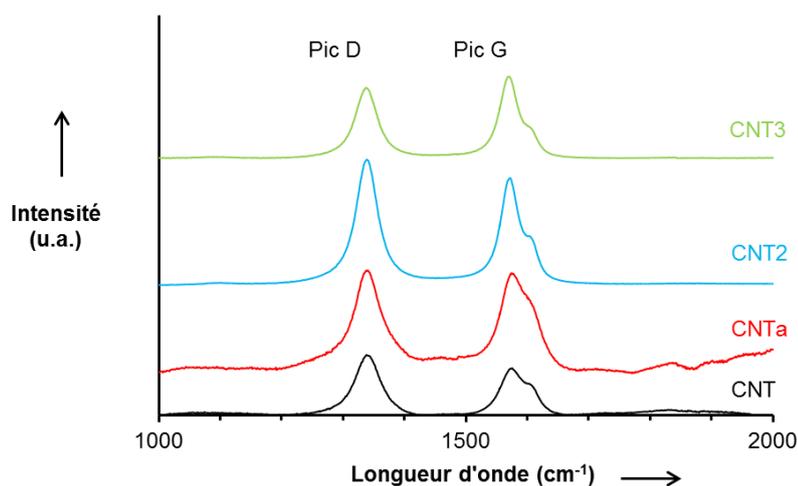


Figure 41 : Comparaison des spectres Raman de nanotubes de carbone bruts (CNT, en noir), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa, en rouge), 2 h à 2000°C (CNT2, en bleu), et 3 h à 2000°C (CNT3, en vert).

La **Figure 42** nous permet de comparer les morphologies cellulaires des macrophages après exposition aux CNT et coloration au MGG. Une majorité des CNT a interagi avec les macrophages, sans qu'il soit possible de distinguer si les CNT étaient présents en surface des macrophages ou internalisés au sein du cytoplasme. L'aspect morphologique après exposition, quel que soit le type de CNT est apparue équivalente.

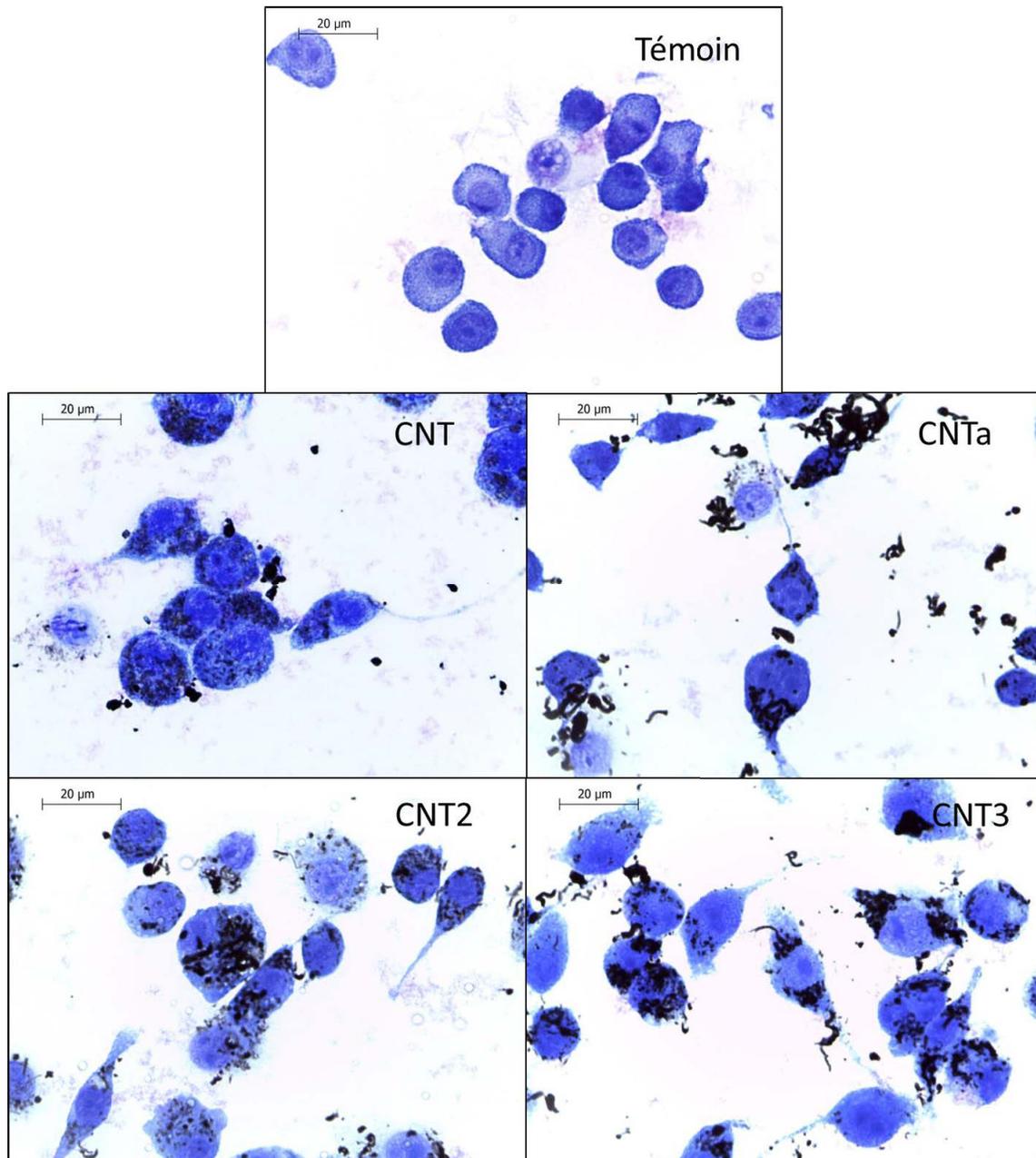


Figure 42 : Macrophages murins RAW 264.7 après coloration MGG. Cellules témoins, CNT : cellules exposées 24 h à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone bruts, CNTa cellules exposées 24 h à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone recuits à 2125°C 1h, CNT2 cellules exposées 24 h à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanotubes de carbone recuits à 2125°C 1h.

Seule la dose la plus élevée de CNT ($120 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a déclenché une cytotoxicité, comme en témoigne la **Figure 43**. Aucune différence significative, n'a été détectée entre les taux de LDH relargués à $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CNT. La **Figure 44** présente les concentrations en TNF- α engendrées par l'exposition aux CNT. Après recuit, une augmentation significative de la réponse pro-inflammatoire, dose-dépendante, a été détectée. Cependant, cette augmentation ne semble pas dépendre des caractéristiques du traitement de recuit (différences non significatives). La production de ROS engendrée par l'exposition des macrophages aux CNT était très élevée et dose-dépendante (**Figure 45**). Aucune différence significative du stress oxydant n'était observable après recuit des CNT.

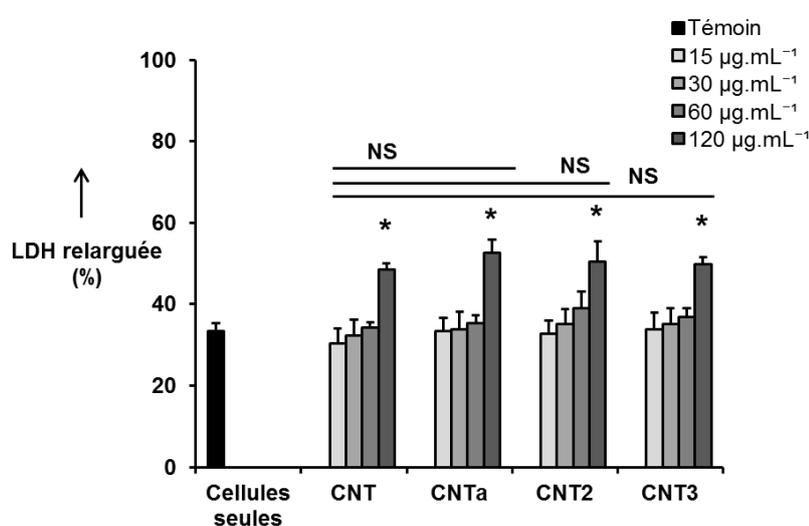


Figure 43 : Etude de la cytotoxicité par mesure de la LDH relarguée après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), NS : résultats non significativement différents entre les types de CNT.

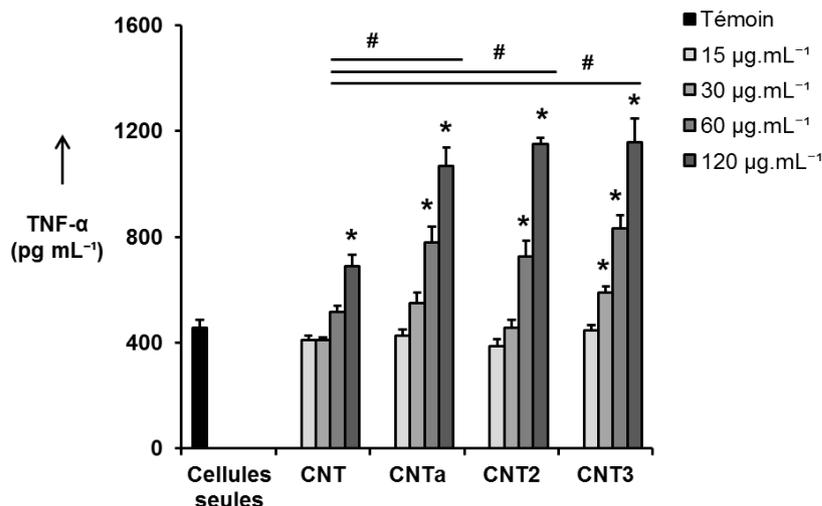


Figure 44 : Etude de la réponse pro-inflammatoire par dosage du TNF- α après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), # : résultats significativement différents entre les types de CNT.

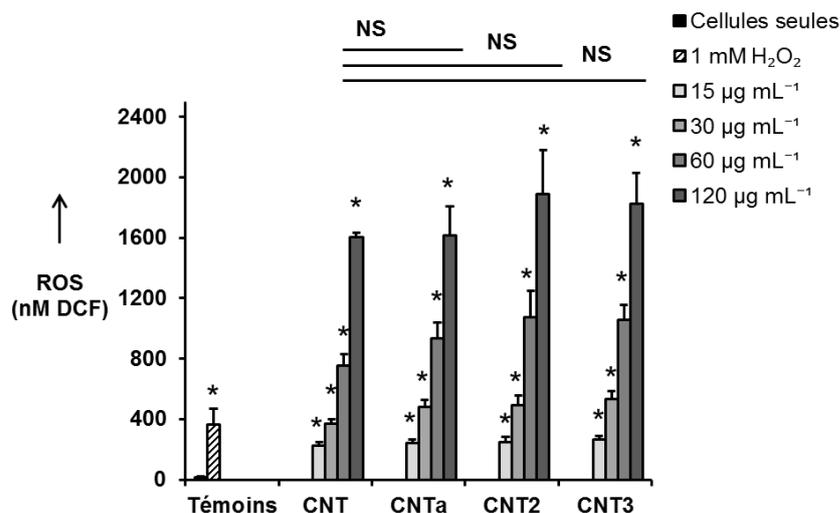


Figure 45 : Etude du stress oxydant par dosage des ROS après 90 min de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT) recuits sous Ar 1 h à 2125°C (CNTa), 2 h à 2000°C (CNT2), et 3 h à 2000°C (CNT3). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), NS : résultats non significativement différents entre les types de CNT.

En conclusion, si des différences de cristallisation ont été détectées après les différents recuits des CNT, cela ne semble pas engendrer de différences au niveau des paramètres biologiques étudiés. Pourtant, les études de Shukla & Mishra (2010) et Galano et al. (2010) ont montré que le taux de défauts de structure impacte la réponse pro-inflammatoire et le stress oxydant par le biais d'une activité « scavenger » (voir Chapitre 1 III.3.3.). D'après ces études, le taux de ROS serait susceptible d'augmenter avec l'augmentation de la cristallisation des CNT. Or, nos résultats n'ont montré aucune différence entre les taux de ROS pour les CNT, CNTa, CNT2 et CNT3. Pour expliquer les valeurs de ROS identiques provoquées par les CNT et les CNTa, nous avons suggéré une balance entre la diminution des ROS due à la purification et l'augmentation des ROS due à l'augmentation de la cristallisation des CNTa. Pour autant, les CNTa, CNT2 et CNT3 présentaient des taux de purification équivalents mais des taux de défauts de structure différents. D'une part, nous ne disposons que d'une technique pour évaluer le taux de défauts de structure (spectroscopie Raman). Il est donc possible que des incertitudes soient liées à cette mesure. D'autre part, les valeurs de ROS identiques entre les CNTa, CNT2 et CNT3 pourraient suggérer un effet seuil (vers $I_d/I_g = 1$) de l'impact de l'amélioration de la cristallisation sur l'activité « scavenger ».

BILAN CHAPITRE 3 :

Impacts biologiques d'un recuit haute température

Le recuit haute température est un post-traitement permettant de purifier les CNT et de diminuer leur taux de défauts structuraux. L'amélioration de leur structure cristalline permet d'augmenter leurs propriétés électronique et mécanique. Toutefois, nous avons démontré que ce traitement engendrait une augmentation de la réponse pro-inflammatoire, sans diminution de la cytotoxicité ou du stress oxydant.

La réponse pro-inflammatoire semble très sensible à la chimie de surface des CNT. Nous avons vu dans l'article n°1 du Chapitre 2 que la réponse pro-inflammatoire était augmentée par la présence de groupements acides en surface. Et nous avons vu dans l'article n°2 de ce Chapitre 3, qu'elle était aussi accrue par un recuit des CNT. Ce recuit diminue leur hydrophobicité et change *a priori* la nature et la conformation des couches protéiques adsorbées en surface. Cela confirme l'intérêt pour les études de la « corona » protéique.

L'absence de diminution du stress oxydant suite à la purification des impuretés catalytiques métalliques par recuit est surprenante. Nous avons notamment fait le constat dans le Chapitre 2, que la production de ROS semblait dépendre du taux d'impuretés. Néanmoins, il semblerait que le taux de défauts de structure soit lui aussi prépondérant. Un taux plus élevé de défauts de structure pourrait en effet entraîner une activité « scavenger » plus importante. Cela semble cohérent avec la forte diminution des ROS pour les CNT fonctionnalisés à l'acide, présentant un plus fort taux de défauts que les bruts.

En conclusion, le recuit haute température ne semble pas être souhaitable dans le cadre d'une démarche « safer by design ». Dans le chapitre suivant, nous reviendrons sur le premier traitement, la fonctionnalisation acide, et vérifierons son impact biologique sur différents nanomatériaux à base de carbone. Nous comparerons également l'impact de leur morphologie sur la réponse cellulaire.

Chapitre 4. Comparaison des impacts biologiques de nanomatériaux à base de carbone

I. Introduction et méthodologie

Le noir de carbone (CB pour « carbon black ») est l'un des nanomatériaux les plus utilisés dans le monde. Ainsi, le rapport de l'Anses sur les déclarations des substances à l'état nanoparticulaire le classe premier en terme de masse produite ou importée en France (Anses 2013). Il représente plus de la moitié de la quantité totale des substances déclarées. Nous avons vu au Chapitre 1, III.3.5 qu'il s'agissait d'un matériau dont la toxicité avait fait l'objet de nombreuses études qui ont conduit à sa catégorisation comme potentiellement carcinogène pour l'Homme (groupe 2B) (IARC 2010).

Les CNT et le graphène paraissent, au regard du CB, comme des nanomatériaux encore « jeunes » et relativement méconnus. En effet, les premières études sur les CNT et le graphène n'ont qu'une vingtaine ou une dizaine d'années (Iijima 1991; Novoselov et al. 2004). Leurs impacts biologiques, en particulier leur toxicité pulmonaire, restent encore mal définis. Le nano-graphite (NG) plus facile à produire que le graphène simple feuillet est aussi plus souvent utilisé dans les études de toxicité. Le NG et les MWCNT sont de structures et de propriétés très proches. Les comparer permettrait notamment d'obtenir des informations sur l'impact de la morphologie sur la réponse macrophagique. Le CB étant un nanomatériau de référence, il est intéressant de l'inclure dans cette comparaison malgré sa structure non-cristalline.

La fonctionnalisation acide de ces trois nanomatériaux à l'acide permettra d'obtenir des chimies de surface quasi-identiques en y greffant des groupements oxygénés et en purifiant les CNT et le NG des impuretés catalytiques. Dans un premier temps, les impacts d'une fonctionnalisation acide sur la réponse cellulaire de macrophages RAW 264.7 seront étudiés pour les trois nanomatériaux. Nous verrons s'il est possible d'élargir les conclusions tirées au Chapitre 2 pour deux CNT de tailles et de degrés de cristallisation différents à des nanomatériaux de morphologies plus éloignées. Dans un second temps, nous comparerons la toxicité *in vitro* des trois nanomatériaux fonctionnalisés à l'acide.

Les CNT bruts et les CNTf fonctionnalisés à l'acide sont ceux utilisés lors des travaux de la première publication (Figarol et al. 2014) ; les NG proviennent de Graphene Supermarket, et les CB sont des particules de Printex 85. La technique de fonctionnalisation acide est identique à celle utilisée dans le Chapitre 1, mais avec une optimisation du temps et des concentrations pour obtenir un taux de groupements acides équivalent (vérification par XPS, voir les Supplementary data de l'article pour le détail des protocoles).

II. Publication 3

II.1. Article soumis à Journal of Nanoparticle Research

IN VITRO TOXICITY OF CARBON NANOTUBES, NANO-GRAPHITE AND CARBON BLACK, SIMILAR IMPACTS OF ACID FUNCTIONALIZATION

Agathe Figarol ^{† ‡ *}, Jérémie Pourchez ^{‡ *}, Delphine Boudard [#], Valérie Forest [‡], Céline Akono [†], Jean-Marc Tulliani ^β, Jean-Pierre Lecompte ^α, Michèle Cottier [#], Didier Bernache-Assollant [‡], Philippe Grosseau [†]

[†] Ecole Nationale Supérieure des Mines, SPIN-EMSE, CNRS: UMR 5307, LGF, F-42023 Saint-Etienne (France), [‡] Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, EA 4624, SFR IFRESIS, LINA, F-42023 Saint-Etienne (France), [#] Université Jean Monnet Saint-Etienne, EA 4624, SFR IFRESIS, LINA, F-42023 Saint-Etienne; CHU de Saint-Etienne F-42055, Saint-Etienne (France), ^β Politecnico di Torino, Department of Applied Science and Technology, 10129 Torino (Italy), ^α SPCTS Centre Européen de la Céramique CNRS: UMR 7315, F-87068 Limoges, (France).

* Correspondence to: figarol@emse.fr or pourchez@emse.fr

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNT) and nano-graphite (NG) are graphene-based nanomaterials which share exceptional physicochemical properties. They were discovered only a few decades ago, therefore their health impact is unfortunately still not well understood. On the other hand, carbon black (CB) is a conventional and widely studied material. The comparison of these three carbon-based nanomaterials is thus of great interest to improve our understanding of their toxicity. The biological response to CNT, NG and CB modified by acid functionalization were first studied on a murine macrophages cell line. Then, their biological impacts were compared for a similar surface chemistry (after functionalization). RAW 264.7 macrophages were exposed to suspensions of 15 to 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ carbon-based nanomaterials for 90 min to 24 h. Cell morphology was also studied. Acid functionalized carbon-based nanomaterials triggered a weak cytotoxicity similar to the pristine nanomaterials. They increased the pro-inflammatory response, except for CB which did not enhance any significant TNF- α production before or after functionalization. Acid functionalization seemed moreover to strongly decrease the oxidative stress. For equivalent doses expressed in surface, functionalized NG induced a higher cell response than functionalized CNT. Functionalized CB appeared as the safest carbon-based nanomaterials.

The toxicological impact of acid functionalization appeared to follow a similar trend whatever the carbon-based nanomaterial. At equivalent dose expressed in surface and equivalent surface chemistry, the toxicological response from murine macrophages to CNT and NG is higher than for CB. It seemed to correspond to the hypothesis of a platelet and fiber paradigm.

KEYWORDS: carbon black, carbon nanotubes, acid functionalization, graphene, nano-graphite, toxicity

INTRODUCTION

Carbon-based nanomaterials share a unique place in nanotechnologies due to their exceptional electrical, thermal, chemical and mechanical properties. In the last decades, new allotropic forms of carbon were discovered and completed this group. In the present study, a focus will be made on carbon-based nanomaterials with three nanometric dimensions: carbon black (CB), two nanometric dimensions: carbon nanotubes (CNT), and one nanometric dimension graphene or nano-graphite (NG).

CB is a traditional carbon material widely used as a pigment or reinforcing phase in tires. It has been considered as nanomaterial only since a few years. CB typically falls within the ISO definition of a nanomaterial (ISO/TS 27687:2008 2008) with primary particle diameters between 10 and 100 nm. The health effects of CB have been extensively studied. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified CB as possible carcinogenic to humans (Group 2B) (IARC 2010). The IARC reviewed notably an *in vivo* study showing that lung cancer in rats caused by an exposure to CB started after signs of inflammation, cell injury and oxidative stress with the production of reactive oxygen species (ROS).

CNT and graphene are two carbon-based nanomaterials that have demonstrated exciting physicochemical properties since their late discovery, promising thus numerous industrial applications. Multi-walled and single-walled carbon nanotubes (MWCNT and SWCNT respectively) have been studied since the 1990s (Iijima 1991; Iijima and Ichihashi 1993). Graphene was first not thought to be a stable material until Novoselov et al. in 2004 managed to prepare and study a single graphene layer (Novoselov et al. 2004). MWCNT and SWCNT are now produced at an industrial scale, while it is still uneasy to produce graphene at large scale. Most industrials sell nano-graphite (NG), also called graphite nanoplatelets, which is composed of a few layers of graphene and has close physicochemical properties. Their mechanical resistance, electrical conductance and thermal stability are, however, decreasing with the number of graphene layers, i.e. the thickness of the NG.

Compared to CNT or NG, CB is either used in toxicity studies as a negative control (Lam et al. 2004; Bottini et al. 2006; Schinwald et al. 2011) or a positive control (Pulskamp et al. 2007;

Di Giorgio et al. 2011). Due to the late discovery of CNT and NG and the lack of comparable studies, the toxicity data are still incomplete for these nanomaterials. It has been shown that CNT and NG have the potential to trigger inflammation, cytotoxicity and oxidative stress (Schinwald et al. 2011; Chen et al. 2011; Zhang et al. 2012). However, there is no unique toxicity for one type of nanomaterial. There are multiple toxicity profiles depending on the nanomaterial physicochemical properties. It is therefore crucial to fully characterize the nanomaterials before any toxicity study.

Few studies have yet compared the biological effects of CNT and NG. Zhang et al. (Zhang et al. 2010) studied the *in vitro* impacts of NG and SWCNT. The cytotoxicity and oxidative stress in PC12 cell line (derived from a neuroendocrine tumor) were found globally equivalent. However, the cytotoxicity results were dependent of the test used: MTT or LDH. Using a MTT test with a different cell line (human hepatoma HepG2 cells) Yuan et al. (Yuan et al. 2011) observed a higher cytotoxicity for SWCNT than for NG. Nevertheless, MTT is controversial because of biases induced by the CNT (Wörle-Knirsch et al. 2006; Belyanskaya et al. 2007). In their *in vivo* study, Ma-Hock et al. (Ma-Hock et al. 2013) assessed the biological impacts on Wistar rats of a head-nose inhalation of graphene, NG, MWCNT, and CB. Only local inflammation with no further toxicity was detected, with this order of gravity: MWCNT > graphene > NG > CB with CB not inducing any inflammation. Overall, the results remained inconsistent between the toxicological studies. One explanation for these inconsistencies could be the difference in surface chemistry. Indeed, NG and CNT were produced by different methods along the studies and exhibited different level of metallic impurities and oxygen-containing groups.

One way to equalize the surface chemistry of carbon-based nanomaterials is to functionalize their surface by an acid treatment (Figarol et al. 2014). Acid functionalization of CNT is relatively easy to carry out and of great interest for industrials. The CNT hydrophobicity is indeed decreased, so they become more dispersible in aqueous solvents. Moreover, this process purifies the CNT from their metallic impurities, residues of the catalysts used for their production and entrapped into the CNT structure that are dissolved after a strong acid treatment. NG are often produced by the Hummers modified method (Hummers and Offeman 1958) using strong acids to exfoliate graphite, resulting in thin flakes of oxidized NG. The biological impact of the oxygen-containing groups on CNT or NG is still not fully understood. In a previous study (Figarol et al. 2014), we demonstrated that surface acid groups increased the pro-inflammatory response and, to a lesser extent, the cytotoxicity of murine macrophages (RAW 264.7) exposed to functionalized CNT. This trend seemed to be dependent of a threshold in surface acid groups, related to the physicochemical properties of pristine CNT. Other studies showed contradictory results but did not isolate the effects of the CNT purification. In this way, even when selecting the same cell line (i.e. murine macrophages RAW 264.7), the results can be inconsistent. Dong et al. and Wang et al. (Dong et al. 2012; Wang et

al. 2012) found similarly that CNT acid functionalization enhanced the cytotoxicity and the pro-inflammatory response, while Zhang et al. (Zhang et al. 2012) observed a decreased cytotoxicity and only a slight increase in the pro-inflammatory response. On the contrary, Fraczek-Szczypta et al. (Fraczek-Szczypta et al. 2012) detected no change in cytotoxicity but a decrease in cell proliferation due to the CNT acid functionalization. For NG or graphene, the results are more consistent. Oxidized graphene from Hummers method and acid functionalized graphene seemed to decrease the cytotoxicity and oxidative stress compared to exfoliated or pristine NG (Sasidharan et al. 2011; Duch et al. 2011; Sasidharan et al. 2012). The pro-inflammatory response was on the other hand either found to be increased by acid functionalization (Duch et al. 2011) or decreased (Sasidharan et al. 2012). Overall, the understanding of the biological impact of an acid functionalization is still incomplete. To our knowledge, only Zhang et al. (Zhang et al. 2012) compared the in vitro response of CNT and NG with surface acid groups. Differences in cellular uptake were observed between functionalized MWCNT, oxidized NG and nano-diamonds. However, the cytotoxicity of acid functionalized MWCNT, and oxidized NG were not significantly different. The pro-inflammatory response and oxidative stress were unfortunately not assessed.

In the present study, a first objective was to determine if acid functionalization impacts the in vitro cellular response of murine macrophages with a similar pattern for different shapes of carbon-based nanomaterials (i.e. nanotubes, nanoplatelets or nanospheres). Secondly, the biological impacts of acid functionalized MWCNT, CB, and NG showing a similar surface chemistry were compared.

MATERIAL AND METHODS

1. Powders

The multi-walled carbon nanotubes (NC7000TM, Nanocyl, called CNT) were synthesized by CVD and have a diameter of 9.5 nm and a length of 1.5 μm according to the manufacturers. The nano-graphite (NG) was purchased from Graphene Supermarket. The flakes have a 12 nm average thickness and a 4.5 μm average particle size according to the manufacturers. Carbon black (CB) was purchased from Evonik Degussa (Printex[®] 85).

2. Acid functionalization

The acid treatment consisted in an oxidation by refluxing the carbon nanopowders in a solution of nitric and sulfuric acids (3:1 v/v). Functionalized nanomaterials were filtered (0.025 μm MF-Millipore Membrane) and rinsed until the pH reached 5. They were dried in an oven at 100°C for 18h. Concentrations in nanopowders, acid solutions and duration of the oxidation were optimized for each nanomaterial to obtain a comparable level of surface oxygen-

containing groups (see supplementary material **Table A1**). Functionalized carbon-based nanomaterials were called CNTf, CBf and NGf.

3. Physicochemical characterization

Morphologies of the carbon-based nanomaterials were observed using field-emission scanning electron microscopy (FEG-SEM, JEOL JSM 6500F, Akishima, Tokyo, Japan) at a 2 kV. A few milligrams of nanopowder were put on a carbon-coated holey film. Samples were coated with a 3 nm gold layer before FEG-SEM observations. CNT, CNTf, CB and CBf average diameters were measured using FEG-SEM images. ImageJ software was used to measure 100 diameters per picture (repeated three times). Average diameters were expressed as the mean of 300 measurements. Atomic force microscopy (AFM, JPK Nanowizard[®]) was used to confirm the dimensions of the NG and NGf. Samples were prepared by the sonication of a 10 mg.mL⁻¹ NG or NGf suspension in distilled water (5 min, 30%, 3 mm probe, Branson Sonifier). One drop was deposited on a 1 cm² silicon wafer, spread by centrifugation (226 g, 2 min, Megafuge 16R, Thermo Scientific), and dried 10 min at 100°C. Specific surface areas (SSA, m².g⁻¹) were determined by the Brunauer–Emmet–Teller (BET) method, using N₂ adsorption at 77 K after out-gassing at 110°C (Micromeritics ASAP 2000).

After acid functionalization, increase in structural defects were analyzed by Raman spectroscopy (XploRA, Horiba Scientific) with a laser at 532 nm, a x50 objective, a 2400 T network, 20 acquisitions of 20 s giving a spectra between 1000 and 2000 cm⁻¹. Around 1340 cm⁻¹, the D-band (D for disorder) is linked to the sp³ hybridized carbon. Its intensity increases with ill-organized graphite structure (Belin and Epron 2005). Around 1570 cm⁻¹, the G-band (G for graphite) corresponds to a splitting of the E_{2g} stretching mode of graphite. Its intensity is independent from the structural defects. The ratio of both intensities Id/Ig informs on the level of structural lattice defects. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) was used to determine trace metals after mineralization by nitro-hydrochloric acid. It indicated the level of catalytic impurities of the nanomaterials.

The levels of surface acid groups were measured by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and thermal desorption spectroscopy (TDS). The atomic ratio in percentage of O/C was assessed by XPS (with 20% incertitude Thermo VG Thetaprobe, monochromatized Al K α source, 400 μ m width analyzed, 1.3 x 10⁻⁷ Pa of residual pressure). A 1 cm² silicon wafer was covered by a 5 nm gold layer to avoid O contribution from the substrate. One drop of a sonicated 30 μ g.mL⁻¹ suspension of nanomaterials in ethanol (5 min, 30%, 3 mm probe) was deposited on the substrate. The spectra were corrected for Shirley-type backgrounds. Automatic search of the peak positions was conducted from the fixed C_{1s} peak at 284.5 eV. Atomic percentages were calculated from the peak areas and given sensitivity factors. For TDS, 10 mg of carbon nanopowder were heated under vacuum at a heating rate of 20°C.min⁻¹ until

850°C. Two turbomolecular pumps ensured a vacuum of less than 10^{-2} Pa from air atmosphere. A mass spectrophotometer (Balzers QMG 112 quadrupole) collected and analyzed the volatilized elements. Differences in zeta potentials were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ suspensions of nanomaterials in distilled water were prepared by sonication (5 min, 30%, 3 mm probe) for the measurement of zeta potential and isoelectric point (pI).

4. In vitro toxicity assays

4.1. Cell culture

RAW 264.7 macrophages were provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem LGC). This cell line derived from mice peritoneal macrophages modified by the Albeson Murine Leukemia Virus. This cell line is widely studied, robust and allows repeatable results. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin ($10\,000 \text{ U.mL}^{-1}$ and 10 mg.mL^{-1} respectively, Sigma-Aldrich). They were maintained at 37°C under a 5% CO_2 humidified atmosphere.

4.2. Suspensions of carbon-based nanomaterials

A first suspension at $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ carbon-based nanomaterials in supplemented DMEM was prepared in a confined laboratory. Dispersion was carried out by sonication (5 min, 30%, 3 mm probe). Serial dilutions were conducted to obtain concentrations of 160, 80, 40, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of nanomaterials in DMEMc. For the toxicity assays, 1/4 cells suspensions, 3/4 nanomaterials in volume were poured into the wells of 96-well plate. The final concentrations of exposure were thus 120, 60, 30, and $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$. There are within the range of commonly used concentrations (Fraczek-Szczypta et al. 2012; Dong et al. 2012; Wang et al. 2012; Zhang et al. 2012), and have been considered as pertinent by Vietti et al. considering the approximations inherent to an in vitro study (Vietti et al. 2013). The suspension stability was confirmed over 4 days by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, see supplementary data **Figure A1**).

4.3. Cytotoxicity

The dosage of extracellular Lactate dehydrogenase (LDH) leaking from cells with damaged membrane was used to evaluate the cytotoxicity. Cells were seeded in a 96-well plate at 100 000 cells/well and exposed for 24 h to the carbon-based nanomaterials according to the preparation described in the previous paragraph. The CytoTox-96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) was used according to the manufacturer's instructions. Detection was performed using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific) at 450 nm. The

activity of the released LDH was reported as a percentage of the total cellular LDH (measured after the complete lysis of control cells).

4.4. Pro-inflammatory response

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) is one of the main pro-inflammatory cytokines produced by macrophages in an activation context. Cells were seeded in a second 96-well plate at 100 000 cells/well and incubated for 24 h with the nanomaterials. TNF- α production was assessed by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (Quantikine[®] Mouse TNF- α /TNFSF1A Immunoassay, R&D systems). The optical density was determined according to the manufacturer's instructions, using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific) at 450 nm. A standard curve was established and results were expressed in pg.mL⁻¹ of TNF- α .

4.5. Oxidative stress

The measurement of the broad spectrum of intracellular reactive oxygen species (ROS) gave an indicative assessment of the oxidative stress using the specific fluorescent probe DCFHDA DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate). The OxiSelect[™] Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs) was used according to the manufacturer's instructions. The fluorescence intensities were read at 530 nm emission with a 480 nm excitation (Fluoroskan Ascent, Thermo scientific). However, to avoid biased decreases of the fluorescence by the black carbon-based nanomaterials, a correction was applied. This correction is based on acellular standard curves of the fluorescent probe DCF (2',7'-dichlorofluorescein) for each nanomaterial and each dose (see supplementary material **Figure A2** and **Table A2**). Results are presented as a percentage of the ROS produced by cells which were not exposed to carbon-based nanomaterials. A positive control was added which corresponds to cells exposed to 1 mM of H₂O₂.

4.6. Cell morphology

A 24 h exposure of the cells to the smallest doses of CNT (15 μ g.mL⁻¹) was conducted directly on an 8-well chambered coverglass (Lab-Tek[®], Sigma-Aldrich). The cells were then rinsed twice with PBS, dried and conserved at -20°C before a May-Grünwald Giemsa staining (MGG) with a Leica Auto Stainer XL. The stained cells were the observed by optical microscopy (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems) at different magnifications and pictures were captured thank to the software Lasez (Leica Microsystems).

4.7. Statistical analysis

Results were expressed as the mean of three independent experiments, each carried out in triplicates, with standard errors of the mean value. Statistical significance was declared when $p < 0.05$ using a Student test with Tanagra software (Rakotomalala 2005).

RESULTS

1. Physicochemical characterization of carbon-based nanomaterials

The three types of carbon-based nanomaterials exhibited different shapes with one nanometric dimension for the nano-graphite (NG), two for the carbon nanotubes (CNT) and three for the carbon black (CB) (**Figure 1**).

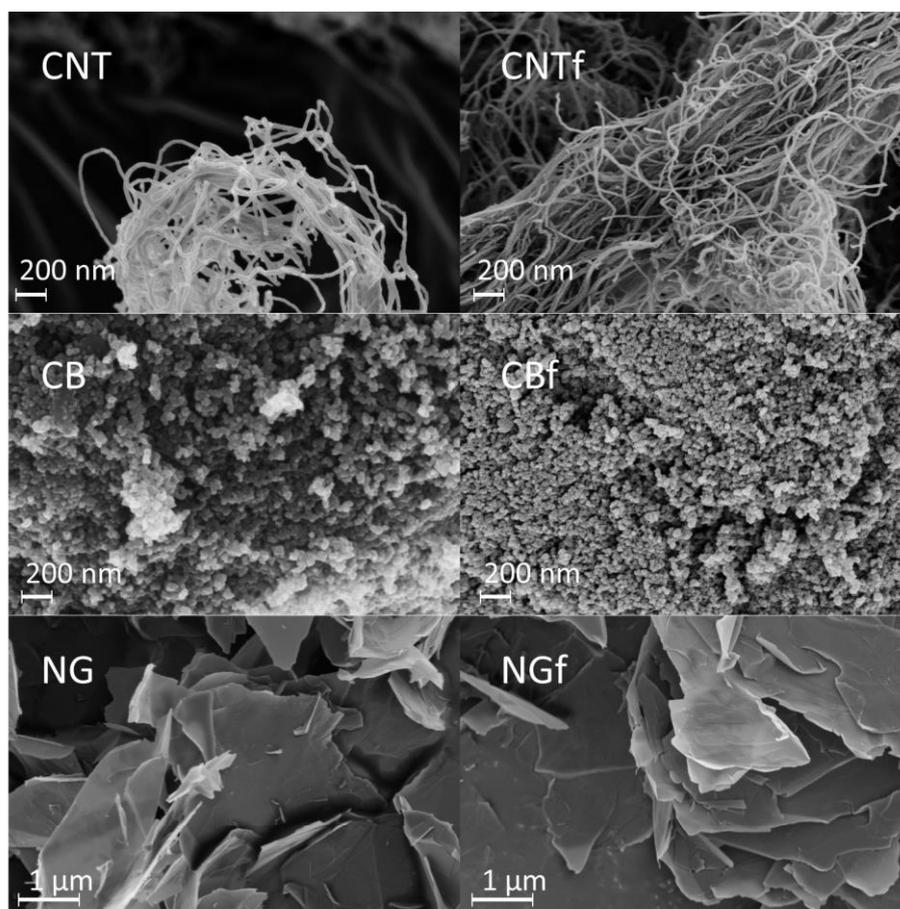


Figure 1: Scanning electron microscopy images of pristine and functionalized carbon-based nanomaterials. Pristine and functionalized carbon nanotubes (CNT and CNTf), pristine and functionalized carbon black (CB and CBf), and pristine and functionalized Nano-graphite (NG and NGf).

Table 1 summarizes the physicochemical characteristics of the pristine and functionalized carbon-based nanomaterial. The nanometric dimensions have been measured either with the scanning electron microscopy (SEM) for CNT and CB diameters or with atomic force microscopy (AFM) for NG thickness. While the nanomaterial shape remained alike, CNT and CB mean diameters decreased after acid functionalization due to the acid attack. On the contrary, the mean thickness of NG increased after acid functionalization. This and the strong

decrease of the specific surface area (SSA) of acid functionalized NG (NGf) will be further discussed and may be explained by a change in aggregation and also porosity in the case of SSA. On the contrary, CB and CNT SSA remained at comparable levels after functionalization. Acid functionalization is also known to increase structural disorder. It has been confirmed for acid functionalized CNT and NG (CNTf and NGf) by Raman spectroscopy, looking at the Id/Ig intensity ratio. Raman spectra are displayed in the supplementary material (**Figure A3**). The results for CB and CBf are not reliable as it is not a crystallized form of carbon. Acid functionalized carbon-based nanomaterials were moreover purified from metallic catalysts. It is mainly remarkable for CNT as the Al level was almost 5 wt.% before functionalization. However, it has to be noticed that pristine NG showed a Fe level of 0.15 wt.% similar to the CNT one. After functionalization it decreased to 0.02 and 0.05 wt.% for NGf and CNTf respectively confirming the purification by the acid treatment.

Table 1: Physicochemical features of the six studied carbon-based nanomaterials.

Sample	CNT	CNTf	CB	CBf	NG	NGf
Mean diameter or thickness (nm)	23 ± 4	16 ± 5	42 ± 10	31 ± 8	20 ± 9	27 ± 12
SSA (m ² .g ⁻¹) ^A	317 ± 2	279 ± 1	184 ± 1	186 ± 2	100 ± 3	27 ± 0
Structural disorder (Id/Ig)	0.82	1.83	0.98 ^B	0.81 ^B	0.14	0.23
Catalytic impurities (wt.%)						
Fe	0.15	0.05	0.01	0.01	0.15	0.02
Al	4.83	0.03	0.05	0.00	0.00	0.00
Co	0.13	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00
O (atomic %)	2	13	8	14	8	14
Zeta potential (mV) in water	-9 ± 8	-48 ± 2	-25 ± 9	-35 ± 6	-23 ± 3	-30 ± 4
Isoelectric point (pH) in water	4.3 ± 0.9	<1.5	3.2 ± 0.4	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	<1.5

^A: SSA : specific surface area, ^B: CB and CBf not well crystallized so the measure is uncertain.

The presence of oxygen-containing groups was assessed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), zeta potential and isoelectric points (pI) (**Table 1**) and by thermal desorption (**Figure 2**). The duration of the acid treatment and the ratio of carbon-based nanomaterial and acids were optimized to obtain a similar level of oxygen-containing groups. C_{1s} and O_{1s} peaks from the XPS spectra allowed the calculation of oxygen atomic percentages

which reached 13 or 14% after functionalization. Before functionalization, the level of oxygen was higher for CB and NG (8%) than for CNT (2%) stating that these pristine nanomaterials presented more oxygen-containing groups. Zeta potentials in water decreased to below -30 mV after functionalization, indicating an increased stability (ISO - International Organization for Standardization 2000). Zeta potentials are very dependent of the pH of the suspensions, whereas pI are considered to avoid this approximation. All acid functionalized carbon-based nanomaterials exhibited pI under 1.9. However, the levels were different for pristine nanomaterials. As for the XPS value, the pristine CNT seemed to present less oxygen-containing groups as its pI was relatively high (4.3). The pI value for CB is not far from the CNT one (3.2). However, it seemed that the level of oxygen-containing groups of NG was already high before functionalization, according to its very low pI value (1.9). This was confirmed by the thermal desorption spectra. CO and CO₂ desorption were followed during the heat treatment of the carbon-based nanomaterials. Oxygen-containing groups are expected to be desorbed and decomposed mainly in CO and CO₂ gases. The masses corresponding to H₂O₂, O, NO and NO₂ were also followed and showed the same trends at lower levels (data not shown). Significantly higher levels of CO and CO₂ were desorbed for CNTf and CBF compared to CNT and CB. The difference was smaller for NG. It thus confirmed that NG had already a high level of oxygen-containing groups before functionalization.

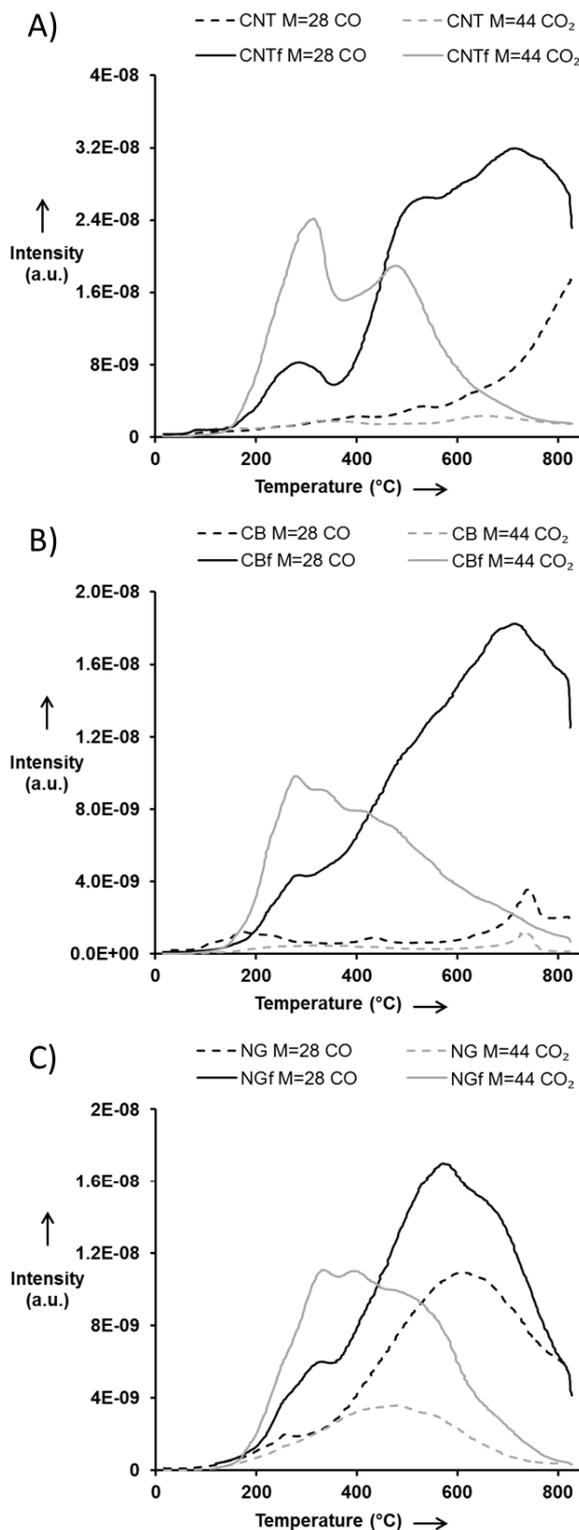


Figure 2: Thermal desorption of CO and CO₂ from pristine and functionalized carbon-based nanomaterials. A) pristine and functionalized carbon nanotubes (CNT and CNTf), B) pristine and functionalized carbon black (CB and CBf), and C) pristine and functionalized nano-graphite (NG and NGf).

2. In vitro toxicity assays on RAW 264.7 macrophages

The in vitro toxicity of the six carbon-based nanomaterials was assessed on a murine macrophage cell line (RAW 264.7). This cell line is widely studied, robust and allows repeatable results. Three different cellular and molecular responses were studied. LDH release informed about the cytotoxicity induced by a 24 h exposure to carbon-based nanomaterials. The production of the cytokine TNF- α (tumor necrosis factor α) informed about the pro-inflammatory activity after a 24 h exposure to carbon-based nanomaterials. ROS production is directly related to oxidative stress, with a shorter activation, so with an evaluation after only 90 min of exposure to carbon-based nanomaterials. Lastly, the cell morphology was observed after 24 h of contact with carbon-based nanomaterials and a MGG (May-Grünwald Giemsa) staining.

2.1. Biological impact of the acid functionalization

Significant LDH releases were only found for the highest dose of CNT, NG and NGf (Figure 3). For NG and NGf, the LDH release seemed however to follow a dose-dependent trend. There was no significant difference in the LDH when comparing the pristine and functionalized carbon-based nanomaterials. Thus, no impact of acid functionalization was shown whatever the carbon-based nanomaterials.

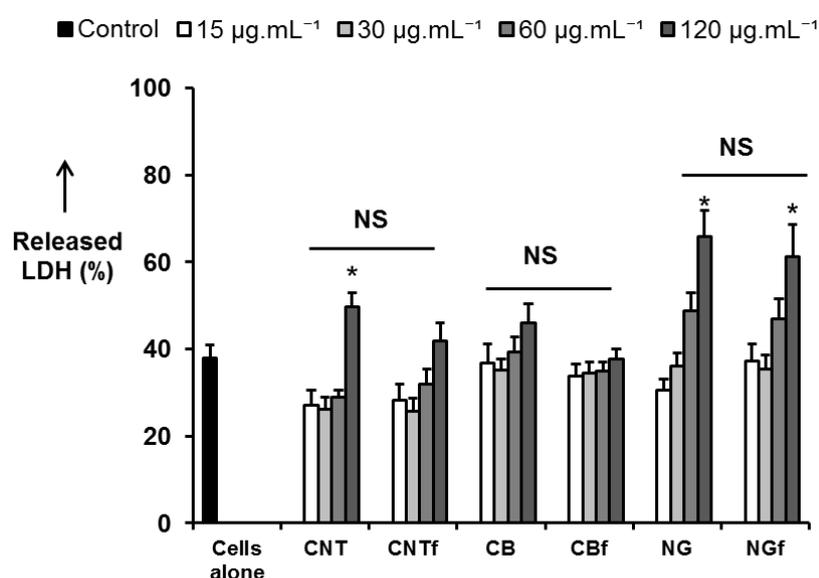


Figure 3: Impact of the acid functionalization of carbon-based nanomaterials on the cytotoxicity. NS: not significant. The cytotoxicity was determined by LDH release after a 24 h exposure. Results are reported to the total cellular LDH measured after lysis of control cells. (n=3, *: significantly higher than the negative control, $p < 0.05$, NS: difference not significant between pristine and acid functionalized nanomaterials)

Figure 4 displays the level of TNF- α after an exposure to the different carbon-based nanomaterials. CNT and NG induced significant pro-inflammatory response at 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, while CNTf and NGf induced a significant response as soon as 60 and 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively with a dose dependent effect. CB and CBf showed no sign of pro-inflammatory enhancement. The acid functionalization seemed thus to increase the pro-inflammatory response, but only if a response was already triggered by the pristine carbon-based nanomaterial.

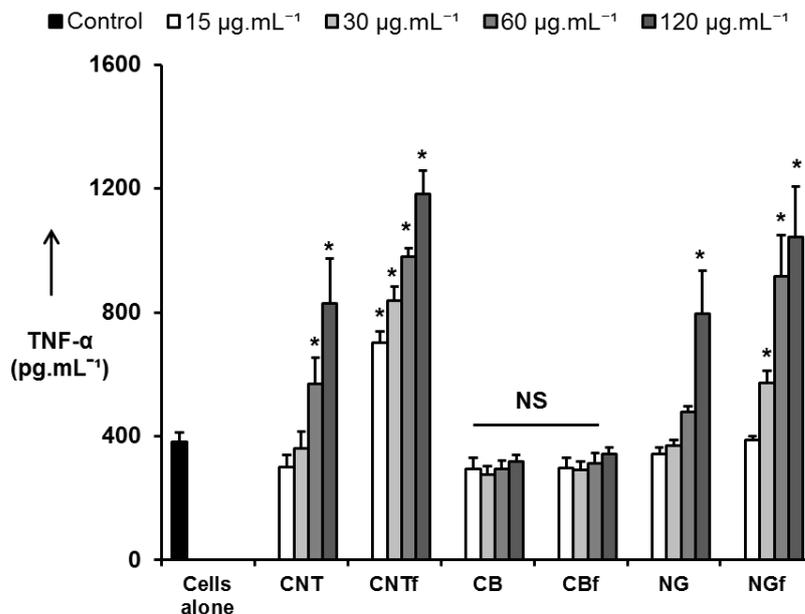


Figure 4: Impact of the acid functionalization of carbon-based nanomaterials on the pro-inflammatory response. The pro-inflammatory activity was evaluated by the level of TNF- α after a 24 h exposure. (n=3, *: significantly higher than the negative control, $p < 0.05$, NS: difference not significant between pristine and acid functionalized nanomaterials)

All pristine carbon-based nanomaterials enhanced ROS production in a dose-dependent manner (**Figure 5**). ROS levels for 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of CNT and CB reached three to four times and two times the level of the positive control respectively. The levels of ROS production were however strongly reduced after functionalization for all types of carbon-based nanomaterials.

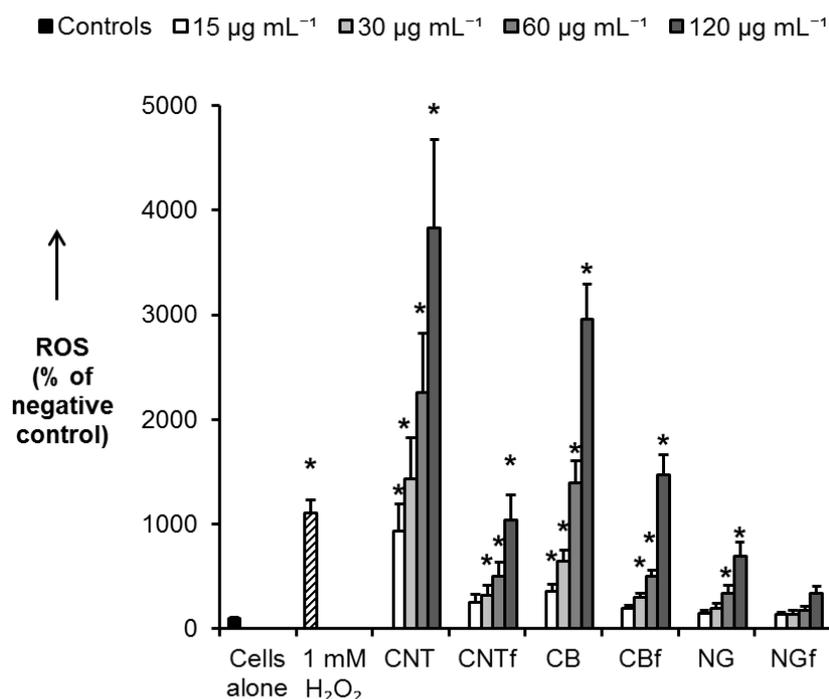


Figure 5: Impact of the acid functionalization of carbon-based nanomaterials on the oxidative stress. Oxidative stress was determined by ROS production after a 90 min exposure. Results are expressed as a percentage of the negative control. (n=3, *: significantly higher than the negative control, $p < 0.05$)

2.2. Comparison of the carbon-based nanomaterials biological impacts

Comparing acid functionalized surface allowed to get rid of the difference in the level of oxygen-containing groups and the content of metallic impurities. The influence of the different SSA was moreover eliminated when looking at the cellular response with doses expressed in surface rather than in mass. The question of dose metric is indeed crucial. The toxicity of a nanomaterial could correlate best with their available surface than with their mass, volume or number (Oberdörster et al. 1992).

At comparable surface, NGf exhibited a stronger cytotoxic response than CNTf and CBf (**Figure 6**). NGf showed also the highest pro-inflammatory response, followed by CNTf (**Figure 7**). CBf induced no cytotoxic and pro-inflammatory response. However, it enhanced an oxidative stress similar to CNTf and NGf (**Figure 8**). MGG observations allowed observing preferential interaction of the carbon-based nanomaterials with the macrophages (**Figure 9**). This technique does not permit to affirm that the nanomaterials were uptaken. It is not possible to make a difference between internalized nanomaterials and those just adhered at the cell surface. However, it was noticeable that all CBf seemed to interact with the macrophages, while

agglomerates and aggregates of CNTf and NGf were found free in the medium. Regarding its small dimensions, CBf is likely to be fully internalized, unlike NG and CNT.

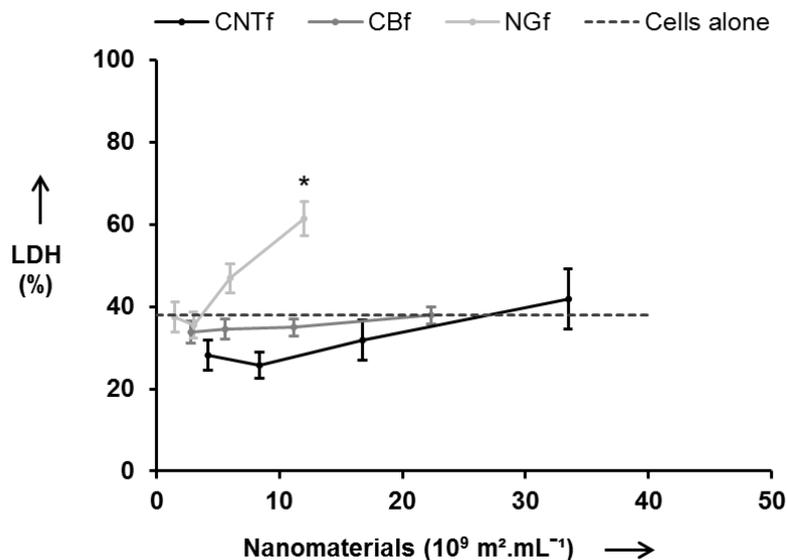


Figure 6: Impact of the morphology on the cytotoxicity of carbon-based nanomaterials. Doses were expressed in unit of acid functionalized surface. The cytotoxicity was determined by LDH release after a 24 h exposure. Results are reported to the total cellular LDH measured after lysis of control cells. (n=3, *: significantly higher than the negative control, p<0.05)

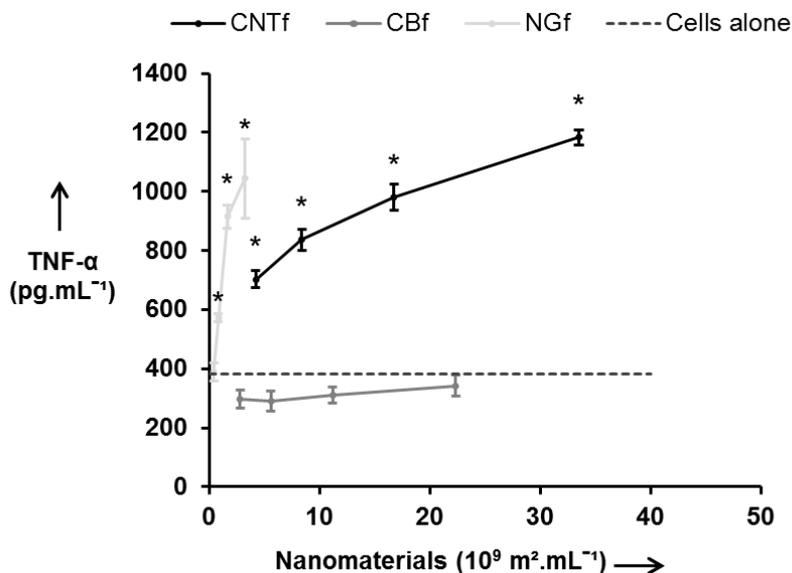


Figure 7: Impact of the morphology on the pro-inflammatory response to carbon-based nanomaterials. Doses were expressed in unit of acid functionalized surface. The pro-inflammatory activity was evaluated by the level of TNF-α after a 24 h exposure. (n=3, *: significantly higher than the negative control, p<0.05)

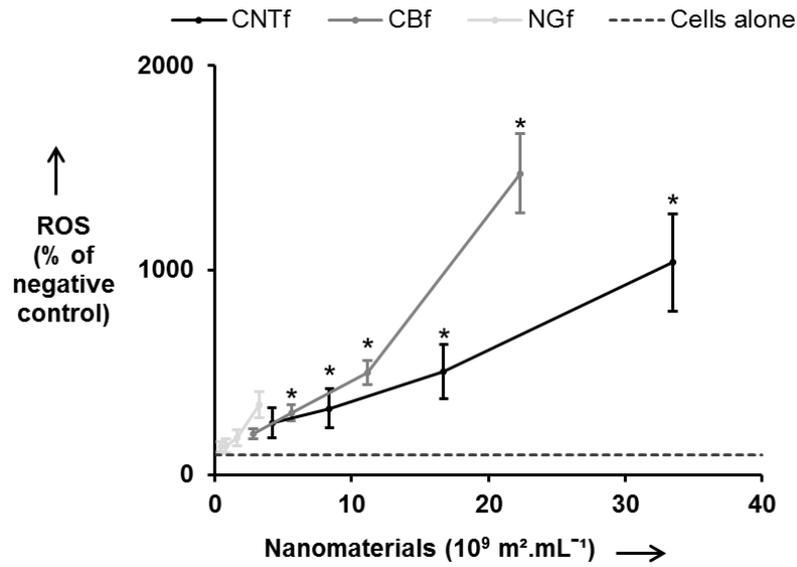


Figure 8: Impact of the morphology on the oxidative stress enhanced by carbon-based nanomaterials. Doses were expressed in unit of acid functionalized surface. Oxidative stress was determined by ROS production after a 90 min exposure. Results are expressed as a percentage of the negative control. (n=3, *: significantly higher than the negative control, $p < 0.05$)

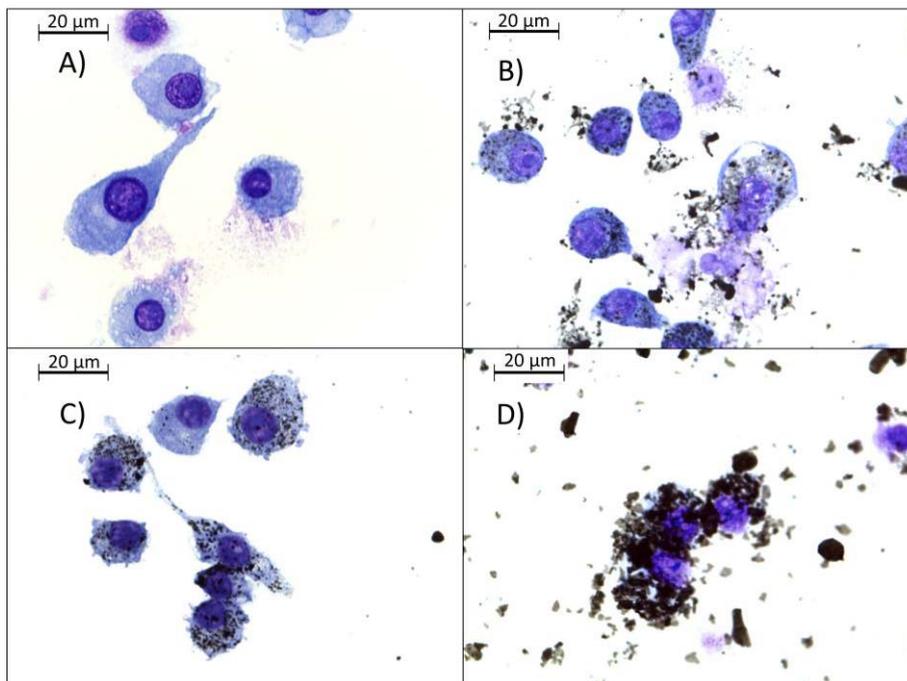


Figure 9: Microscopic images of RAW 264.7 cells exposed for 24h to $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of carbon-based nanomaterials after a May-Grünwald-Giemsa staining. A) negative control: cells alone, B) functionalized carbon nanotubes (CNTf), C) functionalized carbon black (CBf), and D) functionalized nano-graphite (NG).

DISCUSSION

1. Physicochemical impacts of the acid functionalization of carbon-based nanomaterials

This study compares the biological properties of three types of carbon-based nanomaterials, NG, CNT and CB, showing one, two and three nanometric dimensions of the same order of magnitude respectively. The non-nanometric dimensions of CNT and NG were not experimentally confirmed due to the difficulties to measure entangled CNT or agglomerated NG flakes (mean length and mean flake diameter were 1.5 and 4.5 μm according to the producers). At first sight, looking at the electron microscopy images, the acid functionalization did not seem to impact the carbon-based nanomaterials morphology. However, it affected some of the physicochemical features of the carbon-based nanomaterials. All carbon-based nanomaterials were purified by the acid functionalization. The metallic impurities were indeed dissolved in the strong acids (Hamilton et al. 2013; Kim et al. 2014). Mean diameters of CNT and NG were decreased as the surface underwent the acid attack. As shown for CNT (Hu et al. 2003), this same acid attack led to an increase in structural defects observed for CNTf and NGf. However, it was unfortunately not visible for CBf due to the already low crystallization of CB. NG seemed to follow a different trend when considering the increase of its mean thickness after functionalization. It is, though, not significant unlike the strong decrease in SSA. The sample was thoroughly dried, and the measurement was repeated several times, thus this diminution is not believed to be due to an excess of hydration. The SSA reduction almost by 4 of NGf could be explained by differences in agglomeration and structure caused by acid functionalization. The phenomenon could be close to the one suggested by Wang et al. (Wang et al. 2014). These authors witnessed a change in microporosity and mesoporosity of reduced NG after KOH activation. While reduced NG consisted of carbon sheets with stacked carbon layers, the KOH treatment separated them into smaller and thinner sheets. They gathered into large and highly porous structures due to partial interstacking. The resulting available external surface area was significantly smaller than the surface of the small compact agglomerates of reduced NG. It has to be underlined, however, that this phenomenon affects only dried powder. In aqueous media, such as the cell culture media, the dispersion is expected to be higher for functionalized carbon-based nanomaterials due to the surface oxygen-containing groups. This was indeed confirmed by the lower zeta potentials and pI.

It has been pointed out that the levels of oxygen-containing groups were different between the pristine carbon-based nanomaterials. Pristine CNT seemed to contain the lowest level of oxygen-containing groups according to XPS, pI and thermal desorption measurements. Pristine CB showed a medium level of surface oxygen-containing groups. Lastly, pristine NG exhibited a similar atomic percentage of O to CB according to the XPS measurement, but a higher level of oxygen-containing groups according to pI and thermal desorption. As XPS analyzes the

extreme surface, it may miss some oxygen-containing groups linked with the deeper carbon layers. After functionalization, the level of oxygen-containing groups linked with a decrease in hydrophobicity seemed to be equalized between CNTf, CBf and NGf, but could be partially underestimated for NGf for the same reason.

2. Biological impact of the acid functionalization of carbon-based nanomaterials

Our previous study (Figarol et al. 2014) has demonstrated that acid functionalization of carbon nanotubes has a weak impact on cytotoxicity, increased the pro-inflammatory response and decreased the oxidative stress. In this study we showed that the *in vitro* impact on macrophages response to acid functionalization followed the same trend for three types of carbon-based nanomaterials. Little impact on the cytotoxicity was detected, the only responses were at the highest dose of CNT and NG with possibly a slight decrease for CNTf and NGf but not significant. An increase in TNF- α production was observed for CNTf and NGf. It was not observed for CBf, which may be linked with the absence of pro-inflammatory response for the pristine CB. The increase for CNTf and NGf might be due to the difference in surface chemistry. The change in surface charge and decrease in hydrophobicity could impact the adsorbed proteins on the surface of the carbon-based nanomaterial. This protein layer constitutes the corona which can influence the cellular interactions with a carbon-based nanomaterial (Lynch and Dawson 2008). A second assumption to explain the increase of the pro-inflammatory response is the increased available surface for cell interactions. Functionalized carbon-based nanomaterials are indeed expected to present a greater dispersibility in the aqueous culture medium, which could increase the cell response (Wang et al. 2010). On the other hand, ROS production was largely decreased after functionalization of the three carbon-based nanomaterials. For CNT mainly and NG secondly, this can be due to the purification from metallic catalysts. Transition metals such as Fe and Al indeed contribute to ROS production notably by the involvement in the Fenton reaction (Ruipérez et al. 2012; Ge et al. 2012). However, as the response was still significant for purified carbon-based nanomaterials, another source of oxidative stress is involved. Direct interaction between carbon-based nanomaterials and the cells could indeed enhance an oxidative stress. A third mechanism should be mentioned, corresponding to the scavenging capacity. Carbon-based nanomaterials have indeed the potential to reduce the level of oxygenated free radicals in the medium, through surface adsorption or other physicochemical reactions not well understood for now, but increasing with the level of structural defects (Fenoglio et al. 2006; Galano et al. 2010; Martinez et al. 2010). Acid functionalization increased the structural disorder, so the scavenging activity could explain the decrease in ROS production after functionalization for all three nanomaterials.

Other studies on the subject tend to be contradictory. Several studies seemed to conclude also at an increase in macrophages pro-inflammatory response after CNT acid functionalization

(Dong et al. 2012; Wang et al. 2012; Zhang et al. 2012). Few data are available concerning oxidative stress, but some studies on NG suggested also a decrease induced by higher levels of oxygen-containing groups (Sasidharan et al. 2011; Duch et al. 2011; Sasidharan et al. 2012). The last one however concluded at an increase in the pro-inflammatory response after reducing oxidized NG. The cell line and the conditions of exposure were nevertheless different from our study. Tong et al. (Tong et al. 2009) studied simultaneously the *in vivo* impacts of pristine and acid functionalized SWCNT and CB after oropharyngeal aspiration of 10 to 40 μg of nanomaterial per mouse. They found an increase in pulmonary toxicity (both cytotoxicity and inflammation) induced by the functionalization. Our results indicated only an increase in the pro-inflammatory response, but the cytotoxicity levels were already very low for pristine nanomaterials. It would be interesting to compare our powders and those from Tong et al. for an equivalent exposure and a similar experimental design (to avoid the comparison of *in vitro* and *in vivo* experiments).

3. Comparison of carbon-based nanomaterials biological impacts

The cellular impacts of the different carbon-based nanomaterials have been studied with comparable available surface for cell interactions and close surface chemistry. Looking at the results expressed in surface area and not in mass allowed a better differentiation of the cell responses induced by the three carbon-based nanomaterials. Acid functionalization was used as a way to equilibrate the level of oxygen-containing groups and to remove the impurities, so that the differences in surface chemistries were minimized. **Table 2** sums up the comparative results of the *in vitro* response to CNTf, Cbf and NGf. NGf evidenced the highest cellular response. CNTf led to a high pro-inflammatory response and oxidative stress but a low cytotoxicity. Cbf induced the lowest biological response: no cytotoxicity, low inflammation and equivalent oxidative stress. These differences may be due to the difference in morphology and nanometric dimension. The higher response to NGf and CNTf could be related to a platelet or a fiber effect (Schinwald et al. 2011; Tran et al. 2011). Donaldson et al. (Donaldson et al. 2010) explained the classical fiber paradigm as an understanding of three main properties of a nanofiber: biopersistent so that it creates accumulation, thin enough so that its small aerodynamic diameter enable deposition beyond the ciliated airways, and long enough so that it is difficult to be effectively cleared and for macrophages to phagocyte it. The microscopic observations of the cells interacting with carbon-based nanomaterials reinforced this hypothesis. Almost no Cbf remained free in the culture medium, while only part of the NGf and CNTf interacted with the macrophages. Similar trends were also seen for pristine carbon-based nanomaterials (Supplementary material **Figure A4**). Internalization should be easier for round shaped Cbf with nanometric dimension, than for the fiber or platelets with one or two micrometric dimensions. However, no sign of frustrated phagocytosis was clearly observed. When macrophages fail to fully engulf long and rigid CNT or oversized NG platelets, this can indeed lead to frustrated phagocytosis (Brown et al. 2007). Macrophages are then seen

activated, too large nanomaterials can distort the macrophage cytoplasm, rosette-like formation of macrophages or giant cells can be seen around large nanomaterials (Schinwald et al. 2011; Fraczek-Szczypta et al. 2012). As frustrated phagocytosis enhances the pro-inflammatory response and oxidative stress, this could have been a further explanation for the higher cellular response to NGf and CNTf. The study of Zhang et al. (Zhang et al. 2012) displayed a similar cytotoxicity and oxidative stress of HeLa cells to functionalized MWCNT and oxidized NG. However, the cytotoxicity varied according to the used assay. They confirmed moreover that only part of the carbon-based nanomaterials were internalized or tightly bound to the cell membrane. Another explanation for the lowest cellular response to CBf could be its lower crystallinity. It has indeed been shown for nanoparticles such as silica that the crystalline forms trigger higher inflammation and lead to more pathogenicity than amorphous nanoparticles (Fubini et al. 1999; Perkins et al. 2012; Sandberg et al. 2012). Graphene-like structures are made of hybridized sp^2 carbons, or sp^3 carbons linked with the structural defects. CNT and NG are based on this structure and demonstrate a higher chemical reactivity than CB. However, CNTf, CBf and NGf exhibited functionalized groups at their surface that should mask and minimize the impact of the difference in crystallinity.

Table 2: Summary, morphological impact on the cellular response of carbon-based nanomaterials showing comparable surface. -: low response, +: high response, ++: very high response

Cellular response	CNTf	CBf	NGf
Cytotoxicity (LDH)	-	-	+
Pro-inflammatory (TNF-α)	+	-	++
Oxidative stress (ROS)	+	+	+

CONCLUSIONS

This physicochemical and toxicological study was designed with two main objectives: the determination of the cellular impact of the acid functionalization of three different carbon-based nanomaterials, and the cellular impact of these nanomaterials morphology at equivalent surface chemistry. It was demonstrated that acid functionalization has the same impact whatever the carbon-based nanomaterials: no significant impact on cytotoxicity, enhancement of the pro-inflammatory response, and a decrease in oxidative stress. Carbon black however made an exception, as no pro-inflammatory response was seen before or after functionalization. At a similar dose in surface and a similar surface chemistry, nano-graphite showed higher cellular response than carbon nanotubes and even higher than carbon black. Further

investigations have to be carried out to determine if there is a link with the internalization mechanisms and possible frustrated phagocytosis. Carbon-based nanomaterials do not have the same toxicity potential according to their morphology and crystallinity, and it has to be pointed out that the safest one here is considered as a possible carcinogenic to humans. This emphasized the need for further studies on the toxicity of carbon nanotubes and graphene, especially their impacts for a long-term exposure.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Yoann Garnier and Vincent Barnier from the structure and material center (EMSE) for their help regarding the XPS and AFM measurements, and Guy Tournier for his help regarding the thermal desorption analyses.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interests to declare. All authors have approved the final version of this manuscript and its submission.

REFERENCES

- Belin T, Epron F (2005) Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Mater Sci Eng B-Solid State Mater Adv Technol* 119:105–118. doi: 10.1016/j.mseb.2005.02.046
- Belyanskaya L, Manser P, Spohn P, et al. (2007) The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction. *Carbon* 45:2643–2648. doi: 10.1016/j.carbon.2007.08.010
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, et al. (2006) Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett* 160:121–126. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.06.020
- Brown DM, Kinloch IA, Bangert U, et al. (2007) An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon* 45:1743–1756. doi: 10.1016/j.carbon.2007.05.011
- Chen B, Liu Y, Song WM, et al. (2011) In Vitro Evaluation of Cytotoxicity and Oxidative Stress Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Murine RAW 264.7 Macrophages and Human A549 Lung Cells. *Biomed Environ Sci* 24:593–601. doi: 10.3967/0895-3988.2011.06.002
- Di Giorgio ML, Bucchianico SD, Ragnelli AM, et al. (2011) Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 722:20–31. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.02.008
- Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA (2010) Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol* 7:5. doi: 10.1186/1743-8977-7-5
- Dong P-X, Wan B, Guo L-H (2012) In vitro toxicity of acid-functionalized single-walled carbon nanotubes: Effects on murine macrophages and gene expression profiling. *Nanotoxicology* 6:288–303. doi: 10.3109/17435390.2011.573101
- Duch MC, Scott Budinger GR, Liang YT, et al. (2011) Minimizing Oxidation and Stable Nanoscale Dispersion Improves the Biocompatibility of Graphene in the Lung. *Nano Lett* 11:5201–5207. doi: 10.1021/nl202515a
- Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, et al. (2006) Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity? *Free Radic Biol Med* 40:1227–1233. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.010
- Figarol A, Pourchez J, Boudard D, et al. (2014) Biological response to purification and acid functionalization of carbon nanotubes. *J Nanoparticle Res* 16:1–12. doi: 10.1007/s11051-014-2507-y

Fraczek-Szczypta A, Menaszek E, Syeda T, et al. (2012) Effect of MWCNT surface and chemical modification on in vitro cellular response. *J Nanoparticle Res* 14:1–14. doi: 10.1007/s11051-012-1181-1

Fubini B, Zanetti G, Altilia S, et al. (1999) Relationship between surface properties and cellular responses to crystalline silica: Studies with heat-treated cristobalite. *Chem Res Toxicol* 12:737–745. doi: 10.1021/tx980261a

Galano A, Francisco-Marquez M, Martinez A (2010) Influence of Point Defects on the Free-Radical Scavenging Capability of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Phys Chem C* 114:8302–8308. doi: 10.1021/jp101544u

Ge C, Li Y, Yin J-J, et al. (2012) The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. *NPG Asia Mater* 4:e32. doi: 10.1038/am.2012.60

Hamilton RF, Wu Z, Mitra S, et al. (2013) Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on in vitro and in vivo toxicity, inflammation and lung pathology. Part Fibre Toxicol 10:57. doi: 10.1186/1743-8977-10-57

Hu H, Zhao B, Itkis ME, Haddon RC (2003) Nitric acid purification of single-walled carbon nanotubes. *J Phys Chem B* 107:13838–13842. doi: 10.1021/jp035719i

Hummers WS, Offeman RE (1958) Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc* 80:1339–1339. doi: 10.1021/ja01539a017

IARC (2010) Carbon Black. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. Carbon Black Titan. Dioxide Talc, IARC: International Agency for Research on Cancer. WHO Press, p 149

Iijima S (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354:56–58. doi: 10.1038/354056a0

Iijima S, Ichihashi T (1993) Single-Shell Carbon Nanotubes of 1-Nm Diameter. *Nature* 363:603–605. doi: 10.1038/363603a0

ISO - International Organization for Standardization (2000) ISO 14887:2000 Sample preparation - Dispersing procedures for powders in liquids. ISO 14887:2000 24.

ISO/TS 27687:2008 (2008) Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate.

Kim J-E, Kang S-H, Moon Y, et al. (2014) Physicochemical determinants of multi-walled carbon nanotubes on cellular toxicity: influence of synthetic method and post-treatment. *Chem Res Toxicol* 27:290–303. doi: 10.1021/tx400397g

Lam C-W, James JT, McCluskey R, Hunter RL (2004) Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. *Toxicol Sci* 77:126–134. doi: 10.1093/toxsci/kfg243

Lynch I, Dawson KA (2008) Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 3:40–47. doi: 10.1016/S1748-0132(08)70014-8

Ma-Hock L, Strauss V, Treumann S, et al. (2013) Comparative inhalation toxicity of multi-wall carbon nanotubes, graphene, graphite nanoplatelets and low surface carbon black. Part Fibre Toxicol 10:23. doi: 10.1186/1743-8977-10-23

Martinez A, Francisco-Marquez M, Galano A (2010) Effect of Different Functional Groups on the Free Radical Scavenging Capability of Single-Walled Carbon Nanotubes. J Phys Chem C 114:14734–14739. doi: 10.1021/jp1033382

Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, et al. (2004) Electric field effect in atomically thin carbon films. Science 306:666–669. doi: 10.1126/science.1102896

Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, et al. (1992) Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. Environ Health Perspect 97:193–199.

Perkins TN, Shukla A, Peeters PM, et al. (2012) Differences in gene expression and cytokine production by crystalline vs. amorphous silica in human lung epithelial cells. Part Fibre Toxicol 9:6. doi: 10.1186/1743-8977-9-6

Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF (2007) Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. Toxicol Lett 168:58–74. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.11.001

Rakotomalala R (2005) TANAGRA : un logiciel gratuit pour l'enseignement et la recherche. RNTI-E-3. pp 697–702

Ruipérez F, Mujika JI, Ugalde JM, et al. (2012) Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). J Inorg Biochem 117:118–123. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.09.008

Sandberg WJ, Låg M, Holme JA, et al. (2012) Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 β release from macrophages. Part Fibre Toxicol 9:32. doi: 10.1186/1743-8977-9-32

Sasidharan A, Panchakarla LS, Chandran P, et al. (2011) Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. Nanoscale 3:2461–2464. doi: 10.1039/C1NR10172B

Sasidharan A, Panchakarla LS, Sadanandan AR, et al. (2012) Hemocompatibility and Macrophage Response of Pristine and Functionalized Graphene. Small 8:1251–1263. doi: 10.1002/sml.201102393

Schinwald A, Murphy FA, Jones A, et al. (2011) Graphene-Based Nanoplatelets: A New Risk to the Respiratory System as a Consequence of Their Unusual Aerodynamic Properties. ACS Nano 6:736–746. doi: 10.1021/nn204229f

Tong H, McGee JK, Saxena RK, et al. (2009) Influence of acid functionalization on the cardiopulmonary toxicity of carbon nanotubes and carbon black particles in mice. Toxicol Appl Pharmacol 239:224–232. doi: 10.1016/j.taap.2009.05.019

Tran C, Tantra R, Donaldson K, et al. (2011) A hypothetical model for predicting the toxicity of high aspect ratio nanoparticles (HARN). *J Nanoparticle Res* 13:6683–6698. doi: 10.1007/s11051-011-0575-9

Vietti G, Ibouaadaten S, Palmari-Pallag M, et al. (2013) Towards predicting the lung fibrogenic activity of nanomaterials: experimental validation of an in vitro fibroblast proliferation assay. *Part Fibre Toxicol* 10:52–52.

Wang S, Tristan F, Minami D, et al. (2014) Activation routes for high surface area graphene monoliths from graphene oxide colloids. *Carbon* 76:220–231. doi: 10.1016/j.carbon.2014.04.071

Wang X, Guo J, Chen T, et al. (2012) Multi-walled carbon nanotubes induce apoptosis via mitochondrial pathway and scavenger receptor. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 26:

Wang X, Xia T, Ntim SA, et al. (2010) Quantitative Techniques for Assessing and Controlling the Dispersion and Biological Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes in Mammalian Tissue Culture Cells. *ACS Nano* 4:7241–7252. doi: 10.1021/nn102112b

Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF (2006) Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Lett* 6:1261–1268. doi: 10.1021/nl060177c

Yuan J, Gao H, Ching CB (2011) Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: An iTRAQ-coupled 2D LC–MS/MS proteome analysis. *Toxicol Lett* 207:213–221. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.09.014

Zhang T, Tang M, Kong L, et al. (2012) Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages. *J Hazard Mater* 219–220:203–212. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.03.079

Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, et al. (2010) Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells. *ACS Nano* 4:3181–3186. doi: 10.1021/nn1007176

II.2. Supplementary data

SUPPLEMENTARY MATERIAL

A1. Acid functionalization

Table A1 sums up the optimized parameters for the acid functionalization of carbon nanomaterials.

Table A1: Acid functionalization protocol

Nanomaterial name	Nanomaterial (mg)	HNO ₃ (mL)	H ₂ SO ₄ (mL)	Duration (h)
CNT	100	75	25	6
CB	160	120	40	9
NG	50	120	40	9

A2. Stability of the nanomaterial suspensions

The suspension stability was confirmed by dynamic light scattering. This technique gives the average diameter of a spherical particle of a density of 1 and with the same hydrodynamic volume (Z average). So for non-spherical nanomaterials such as CNT and nano-graphite, it cannot be directly linked with a geometrical diameter. However, the evolution of the parameter can indicate if aggregation is occurring in the suspension. **Figure A1** shows the evolution of z average along the time. As it did not change for 96 h, the conclusion was made that the suspensions were stable long enough to carry out the toxicological tests.

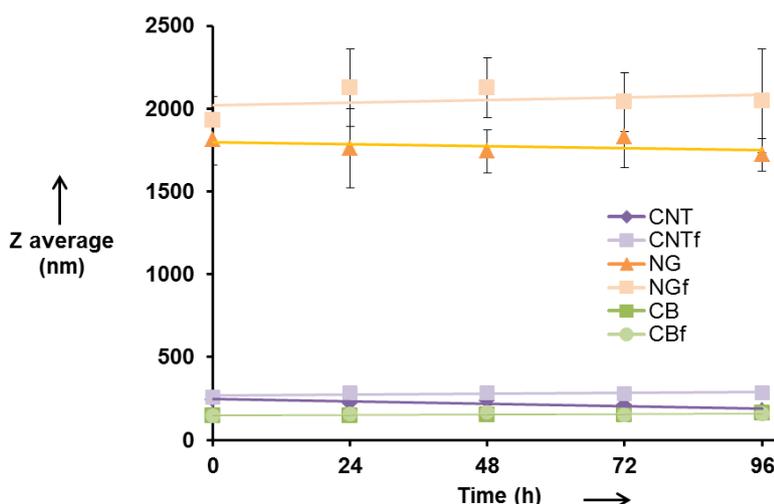


Figure A1: Stability of the nanomaterials over 96 h. Initial suspensions were dispersed by 5 min sonication (30%, 3 mm probe).

A3. ROS assay, biases correction

Our previous study (Figarol et al. 2014) has shown that the ROS assay can be biased by MWCNT. A supplementary assay was thus carried out to assess and correct these biases for all carbon nanomaterials. The fluorescence of the DCF probe (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) at 0, 10, 100, 1000 nM was measured in acellular complemented culture medium. Carbon nanomaterials were added at concentrations of 15, 30, 60, and 120 µg.mL⁻¹. The difference between the fluorescence with and without carbon nanomaterials was calculated for each sample. **Figure A2** shows an example of the obtained correction curves, and **Table A2** summarizes the correction for each MWCNT sample. This correction was the applied to the data from the ROS (reactive oxygen species) assay to obtain corrected values.

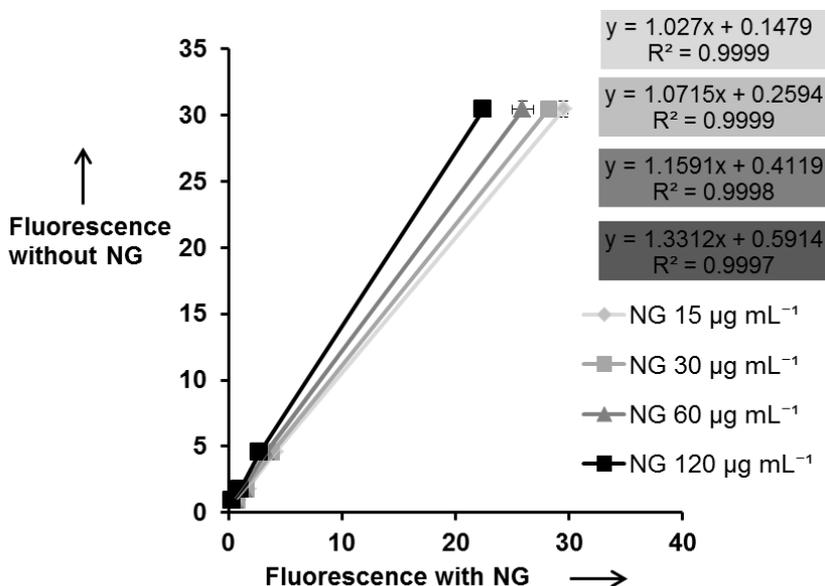


Figure A2: Bias between fluorescence of 0 to 10000 nM DCF, with and without pristine nano-graphite.

Table A2: Corrections of bias in the oxidative stress detection assay ($R^2 > 0.98$).

Powder	Correction at 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Correction at 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
CNT n°1	$y = 1.37x + 0.46$	$y = 1.69x + 0.63$	$y = 2.59x + 0.79$	$y = 4.53x + 0.93$
CNT n°2	$y = 1.42x + 0.26$	$y = 1.83x + 0.45$	$y = 2.67x + 0.67$	$y = 4.52x + 0.86$
CNT n°3	$y = 1.38x + 0.42$	$y = 1.91x + 0.57$	$y = 2.87x + 0.78$	$y = 5.10x + 0.94$
CNTf n°1	$y = 1.23x + 0.37$	$y = 1.49x + 0.45$	$y = 2.09x + 0.59$	$y = 3.11x + 0.69$
CNTf n°2	$y = 1.22x + 0.22$	$y = 1.40x + 0.41$	$y = 1.82x + 0.60$	$y = 2.72x + 0.70$
CNTf n°3	$y = 1.15x + 0.13$	$y = 1.30x + 0.25$	$y = 1.60x + 0.43$	$y = 2.23x + 0.60$
CB n°1	$y = 1.25x - 0.17$	$y = 1.46x - 0.03$	$y = 1.78x + 0.93$	$y = 2.56x + 1.14$
CB n°2	$y = 1.21x + 0.26$	$y = 1.47x + 0.40$	$y = 1.84x + 0.68$	$y = 2.87x + 0.79$
CB n°3	$y = 1.19x + 0.25$	$y = 1.28x + 0.47$	$y = 1.65x + 0.48$	$y = 2.40x + 0.60$
CBf n°1	$y = 1.18x + 0.44$	$y = 1.34x + 0.43$	$y = 1.58x + 0.79$	$y = 2.10x + 1.07$
CBf n°2	$y = 1.20x + 0.10$	$y = 1.32x + 0.42$	$y = 1.60x + 0.58$	$y = 2.32x + 0.74$
CBf n°3	$y = 1.10x + 0.18$	$y = 1.14x + 0.42$	$y = 1.35x + 0.48$	$y = 1.81x + 0.61$
NG n°1	$y = 1.03x + 0.16$	$y = 1.07x + 0.27$	$y = 1.16x + 0.43$	$y = 1.33x + 0.61$
NG n°2	$y = 1.08x + 0.05$	$y = 1.18x + 0.24$	$y = 1.26x + 0.47$	$y = 1.56x + 0.64$
NG n°3	$y = 1.06x + 0.20$	$y = 1.13x + 0.32$	$y = 1.30x + 0.47$	$y = 1.65x + 0.69$
NGf n°1	$y = 0.98x + 0.26$	$y = 1.12x + 0.14$	$y = 1.16x + 0.32$	$y = 1.27 + 0.56$
NGf n°2	$y = 1.02x + 0.14$	$y = 1.12x + 0.17$	$y = 1.21x + 0.37$	$y = 1.48x + 0.55$
NGf n°3	$y = 1.00x + 0.33$	$y = 1.03x + 0.44$	$y = 1.19x + 0.45$	$y = 1.33x + 0.64$

A3. Raman spectra

For crystallized carbon nanomaterials, Raman spectra exhibited two main bands (**Figure A3**). They are called the D-band (1340 cm^{-1}) and the G-band (1570 cm^{-1}). Two overtone peaks were also observed ($> 2500 \text{ cm}^{-1}$).

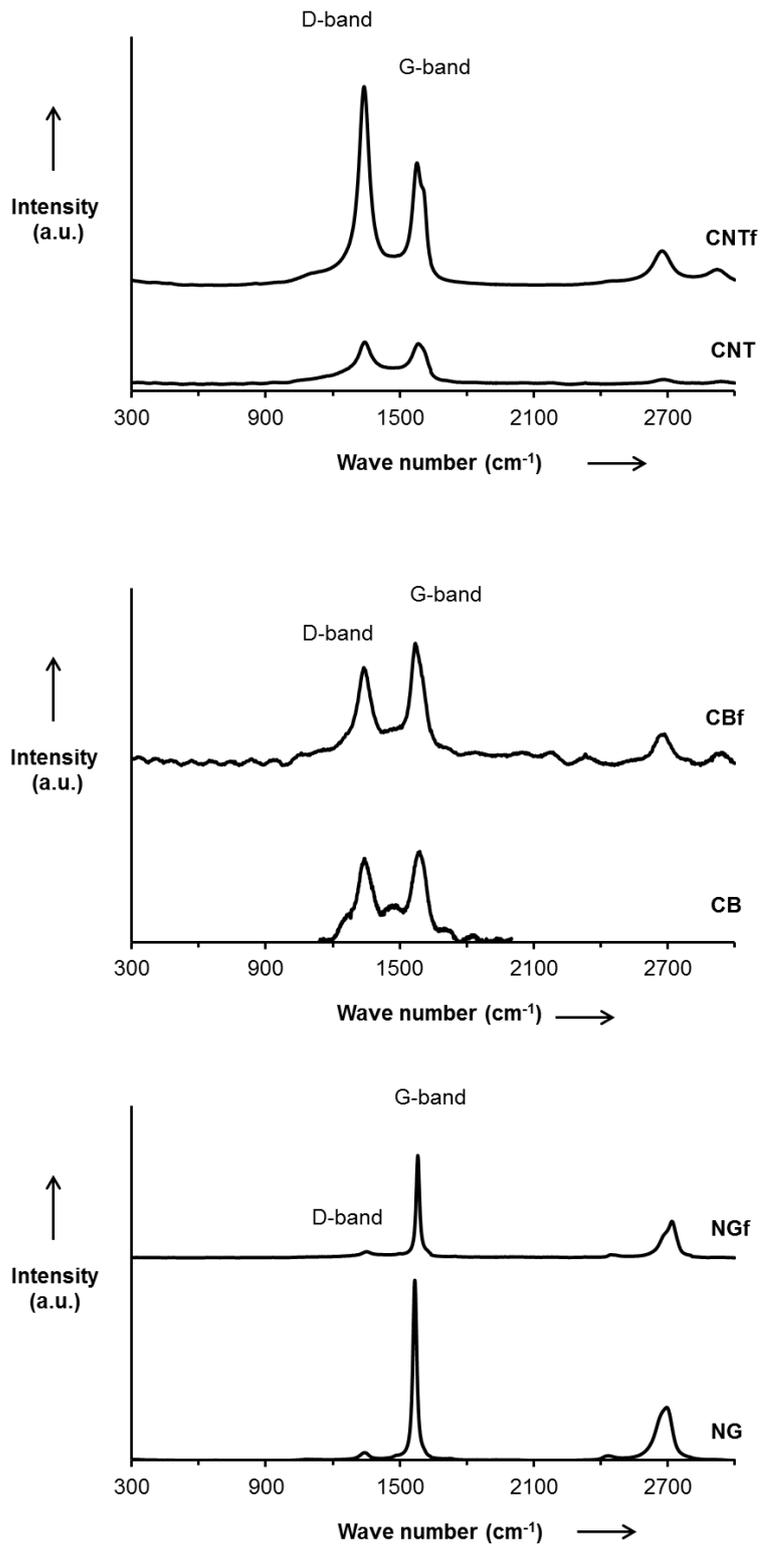


Figure A3: Raman spectra of pristine and functionalized carbon nanotubes (CNT and CNTf), carbon black (CB and CBf), and nano-graphite (NG and NGf). a.u.: arbitrary units. The CB spectrum is limited from 1000 to 2000 cm⁻¹ because it was difficult to obtain a workable spectrum otherwise.

A4. Cell morphology

Similar trends were found when comparing the cell morphology after an exposure to pristine or functionalized carbon nanomaterials (**Figure A4**). Interaction between carbon nanomaterials and cells were visible and seemed stronger with CB than CNT or NG.

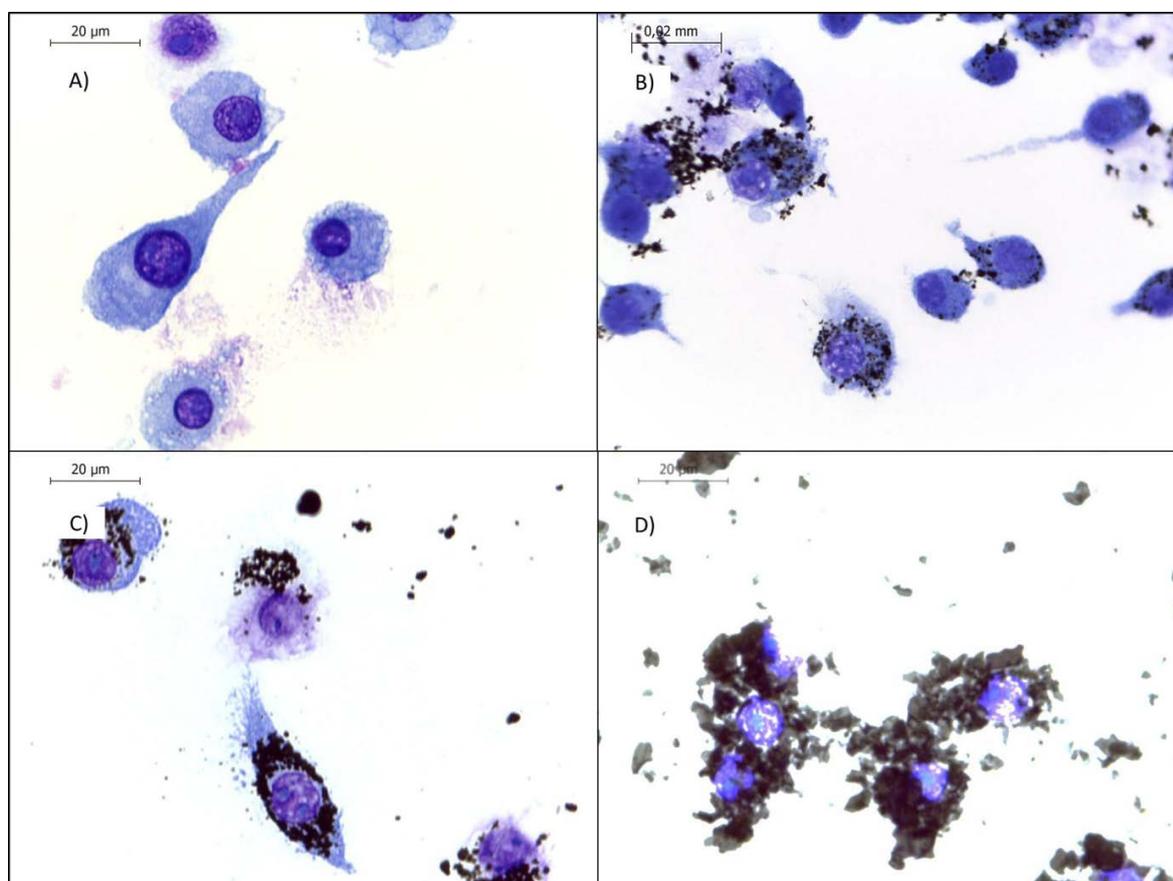


Figure A4: Microscopic images of RAW 264.7 cells exposed for 24h to 15 μg.mL⁻¹ of carbon nanomaterials after a May-Grünwald-Giemsa staining. A) negative control, cells alone, B) pristine carbon nanotubes (CNT), C) pristine carbon black (CB), and D) pristine nano-graphite (NG).

REFERENCE

Figarol A, Pourchez J, Boudard D, et al. (2014) Biological response to purification and acid functionalization of carbon nanotubes. *J Nanoparticle Res* 16:1–12. doi: 10.1007/s11051-014-2507-y

BILAN CHAPITRE 4 :

Comparaison des impacts biologiques de nanomatériaux à base de carbone

Dans ce chapitre nous avons vu que les impacts sur la toxicité *in vitro* d'une fonctionnalisation acide étaient similaires pour des CNT, du NG et du CB en terme d'activité biologique ; sans changement significatif de la cytotoxicité, avec une augmentation de la réponse pro-inflammatoire, et une diminution du stress oxydant. Une exception est toutefois à souligner : aucune augmentation de la réponse pro-inflammatoire n'a été détectée pour le CB fonctionnalisé. Néanmoins, le CB brut n'induisait pas non plus de réponse pro-inflammatoire. L'impact de la fonctionnalisation acide ne semble donc pas dépendre de la morphologie du nanomatériau à base de carbone. Cela est cohérent avec nos hypothèses des Chapitres 2 et 3. La présence de groupements oxygénés en surface serait principalement responsable de l'augmentation de la réponse inflammatoire (si une telle réponse est déjà déclenchée par le matériau brut). Il est possible que la nature des groupements oxygénés soit variables selon les types de nanomatériaux (ainsi que semble l'indiquer les différences de profils des pics en TDS), ce qui pourrait être vérifié avec une déconvolution des pics d'XPS par exemple. Cependant, de telles différences ne semblent pas influencer les réponses cellulaires étudiées. La purification des impuretés catalytiques diminue le stress oxydant, mais le taux de défauts de structure pourrait aussi avoir un rôle spécifique *a priori* par le biais d'un effet de type « scavenger ».

Cependant, même si les réponses cellulaires semblent globalement avoir un profil proche, l'activité biologique engendrée par ces trois nanomatériaux à base de carbone n'est pas de même intensité. La comparaison s'est faite après fonctionnalisation et à dose équivalente en surface afin de minimiser les différences de chimie de surface. Le stress oxydant déclenché par les trois nanomatériaux semble équivalent. Par contre, les NGf induisent la cytotoxicité et la réponse pro-inflammatoire les plus élevées, suivi des CNTf, et enfin des CBf. Cela semble donc être en accord avec le paradigme de la pathogénicité des fibres et des plaquettes. Dus à leur rapport de forme élevé (longueur/diamètre ou largeur/épaisseur), les CNT et les NG sont en effet plus susceptibles d'entraîner une toxicité dite de « contact », voire une phagocytose frustrée, et de déclencher une réponse biologique plus élevée que le CB sphérique avec trois dimensions nanométriques.

Ce chapitre a confirmé que des biais provenant de la présence des CNT mais aussi d'autres nanomatériaux à base de carbone pouvaient fausser la détection des ROS. Dans le chapitre suivant, nous nous interrogerons sur l'impact des CNT sur la détection de la LDH, et explorerons d'autres tests de mesure du stress oxydant.

Chapitre 5. Etudes exploratoires

I. Interférences possibles avec les autres tests de toxicité

Comme nous l'avons vu en Chapitre 1, III.2.2., des interférences dues à la présence de CNT peuvent venir fausser les résultats des tests de toxicité. Trois mécanismes principaux peuvent expliquer l'interférence de nanomatériaux comme les CNT avec les tests colorimétriques ou fluorimétriques employés usuellement en nanotoxicologie (Kimberly J Ong 2014) :

1. fluorescence ou absorbance intrinsèque des CNT,
2. interactions entre les CNT et les réactifs du test,
3. interactions entre les CNT et les molécules à doser (ex TNF, LDH ou ROS).

Un biais dans la lecture de la fluorescence a ainsi été détecté et systématiquement corrigé pour la mesure des ROS (voir Chapitre 2, III.1.). Nous considérerons ici la possibilité de biais existant pour nos deux autres tests de toxicité *in vitro*.

I.1. Interférences possibles dans la mesure du TNF- α

Une étude préalable avait été réalisée au sein du laboratoire afin de déterminer l'importance des biais dans la mesure du TNF- α par test ELISA (Pailleux et al. 2013). Une dégradation du TNF- α au cours du temps (7%_m (% massique) en moyenne, après 24 h) et une adsorption de 6%_m du TNF- α sur les parois des puits de culture ont ainsi été détectées. Ces valeurs sont équivalentes que les cellules soient exposées ou non à des nanoparticules. Elles ne peuvent donc pas induire de faux-négatifs ou de faux-positifs. Il est néanmoins intéressant de souligner que les valeurs finales de TNF- α peuvent être sous-estimées.

Pailleux et al ont également mis en évidence une adsorption de 13%_m du TNF- α lors d'un contact avec des nanoparticules de boehmite. Au cours de cette thèse, nous avons considéré que les CNT avaient été éliminés lors des nombreux lavages nécessaires avant la lecture de l'absorbance pour ce dosage du TNF- α . Aucune interférence ne semble donc pouvoir biaiser directement la révélation colorimétrique. Cependant, au vu de l'étude de Pailleux et al, et des capacités connues d'adsorption des CNT, il est possible qu'une partie du TNF- α produit par les macrophages soit adsorbée en surface des CNT. Ces derniers pourraient alors gêner la reconnaissance du TNF- α par les anticorps primaires, et les complexes CNT/TNF- α pourraient être éliminés par rinçage. Une sous-estimation de la concentration de TNF- α produite par les macrophages exposés aux CNT est ainsi possible.

Dans nos études toutefois, les concentrations de TNF- α étaient significativement plus élevées que le témoin négatif. La sous-estimation possible du signal ne nous a pas conduits à de faux-négatifs. Toutefois, il serait intéressant de vérifier, en se basant sur la méthodologie

développée par Pailleux et al. (2013), si une telle absorbance des TNF- α sur les CNT est réelle, et si oui dans quelle proportion se situe la sous-estimation.

I.2. Interférences possibles dans la mesure de la lactate déshydrogénase

I.2.1. Bilan bibliographique sur les biais du test LDH

La possibilité d'un biais du test LDH afin d'évaluer la cytotoxicité induite par les nanomatériaux à base de carbone reste encore controversée. Les résultats contradictoires mis en évidence par différentes études (mis à part pour le test MTT) peuvent provenir en partie d'interférences inhérentes à la nature de ces tests biologiques avec des nanomatériaux. Le test LDH utilisé pour nos études (Cytotox 96® Non-radiative Cytotoxicity Assay, Promega) est basé sur la détection colorimétrique (à 450 nm) d'un sel de formazan.

Il existe deux grandes familles de tests permettant de quantifier le relargage de la LDH par les cellules d'intérêt : les tests de fluorescence et colorimétriques. D'une part, pour une détection de la LDH basée sur une lecture de fluorescence, il est possible de détecter un biais s'exprimant par une diminution de la fluorescence due à la présence de CB ou de SWCNT (Monteiro-Riviere et al. 2009). En revanche Wan et al. (2013) ont détecté une réduction du signal, mais non significative, par des SWCNT fonctionnalisés à l'acide, alors qu'aucune interférence n'a été détectée avec du graphène-oxyde.

D'autre part, pour une détection de la LDH basée sur des tests colorimétriques, des interférences peuvent apparaître. Une augmentation de l'absorbance à 540 nm due à la présence de carbone activé et de suie a ainsi été mise en évidence par Holder et al. (2012, p.2). Enfin, l'étude d'Holder et al. a montré une adsorption possible de la LDH sur les nanoparticules à base de carbone (**Figure 46**). L'étape de centrifugation, non présente habituellement, permet d'éliminer une partie des CNT du surnageant mais aussi la LDH liée aux nanoparticules à base de carbone. Kroll et al. (2011), en revanche, n'ont pas détecté d'influence du CB sur l'activité de la LDH.

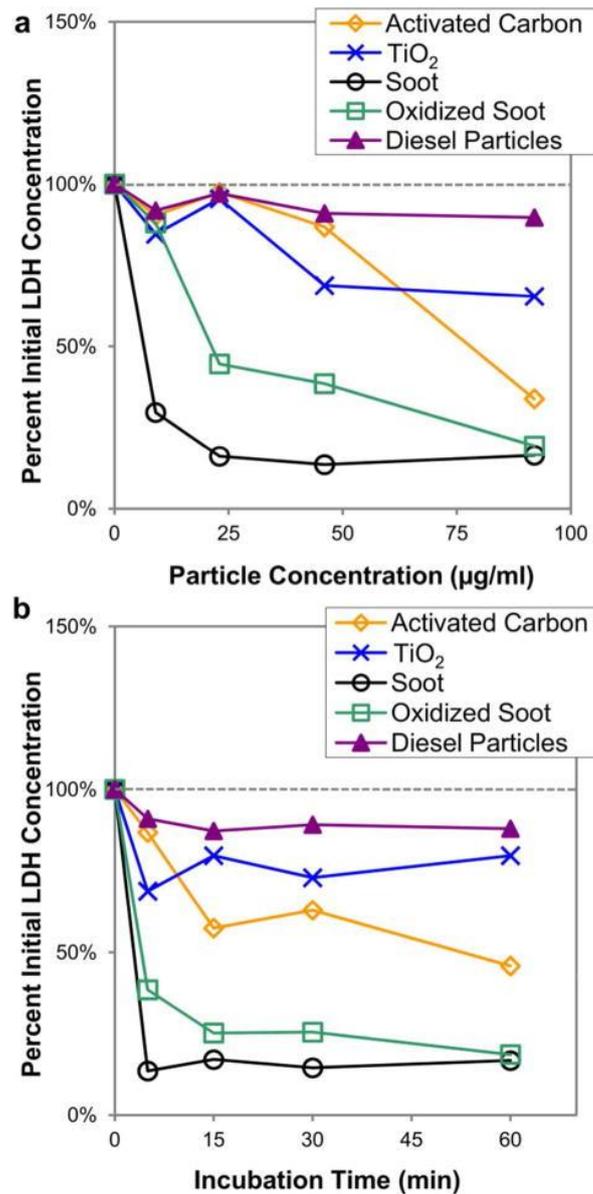


Figure 46 : Mise en évidence de l'adsorption de la LDH sur des nanoparticules à base de carbone : pourcentage de LDH (de concentration initiale 0,15 U/mL) dans le surnageant (centrifugation 10 min à 115 g) a) après 15 min d'incubation avec différentes doses de nanoparticules, b) après 5 à 60 min d'incubation avec $46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanoparticules (Holder et al. 2012, p.2).

Dans ce contexte plutôt incertain quant à la fiabilité des mesures de cytotoxicité de nanoparticules de carbone basées sur la détection de la LDH, Ali-Boucetta, Khuloud T Al-Jamal, et al. (2011) ont proposé un protocole spécifique permettant d'éviter les interférences créées par la présence de MWCNT sur le test de quantification de la LDH. Le principe est de doser la LDH intracellulaire et non plus extracellulaire dans le surnageant de culture. Les CNT

libres dans le surnageant sont éliminés et les puits rincés. L'impact direct de l'absorbance des CNT sur la lecture est donc a priori éliminé. Les cellules rincées sont ensuite lysées. Chaque lysat est récolté et placé dans un eppendorf avant de subir une centrifugation pour faire sédimenter les CNT. Le surnageant est ensuite utilisé pour réaliser un test « classique » de LDH. Au final la concentration de LDH est relative au nombre de cellules viables et non plus à celui des cellules endommagées. Toutefois, selon notre propre expérience et selon d'autres auteurs comme Monteiro-Riviere et al. (2009), il est très difficile d'éliminer la totalité des CNT par simple rinçage des cellules, notamment car certains CNT sont fortement liés à la membrane cellulaire. Nos images de cellules après coloration MGG ont ainsi bien montré la présence de CNT adsorbés aux membranes cellulaires mais aussi aux parois des puits de culture, alors que le protocole de fixation nécessite plusieurs rinçages des lames (**Figure 36**, **Figure 42**, et figures des articles). En conclusion, si certains biais seraient possibles avec le test LDH, la seule étude proposant une méthode pour s'en libérer propose un protocole lourd et possiblement non fiable.

1.2.2. Méthodologie pour la détection des biais du test LDH

Afin de mieux comprendre ce phénomène d'interférence, une étude a été menée sur les MWCNT (Nanocyl NC7000) et le test LDH (Cytotox 96® Non-radiative Cytotoxicity Assay, Promega, voir en Annexe A1.3. Caractérisation biologique) utilisés au cours de cette thèse. La LDH est une molécule fragile, avec une demi-vie de 9h une fois relarguée par les cellules (Ali-Boucetta, Khuloud T Al-Jamal, et al. 2011). Nous avons utilisé la solution de contrôle de LDH issue de cœur bovin, disponible avec l'achat de notre kit, de concentration de $0,8 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. U est l'unité d'activité enzymatique suggérée par l'Union internationale de biochimie. Elle définit une vitesse de diminution de la quantité de substrat par unité de temps. Pour la LDH 1 U correspond à l'oxydation de $1 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ de NADH. Un protocole de test des biais en milieu acellulaire a été développé. Il se base sur le principe de loi de correction du dosage, comme nous l'avions appliqué pour la correction du test de dosage des ROS. Fröhlich et al. (2012) ont utilisé un test similaire pour corriger leur test LDH mais sans détailler le protocole.

Le principe du test LDH est détaillé en Annexe (A1.3.3.). La présence de LDH en milieu extracellulaire catalyse l'hydrolyse du lactate en pyruvate tout en réduisant du NAD^+ en NADH (**Figure 47**). Le NADH ainsi formé est utilisé comme réactif limitant dans une seconde réaction. Un sel de tétrazolium (INT) est transformé en formazan de couleur rouge absorbant à 450 nm. La quantité de formazan est ainsi directement reliée à la quantité de LDH présente dans le milieu.

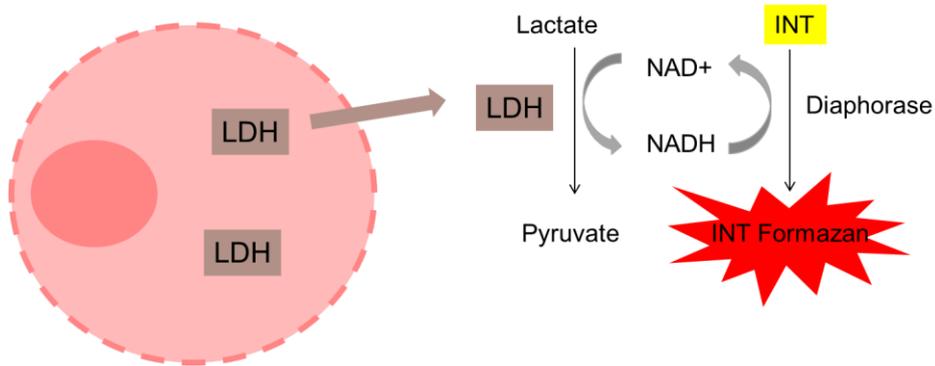


Figure 47 : Principe du test colorimétrique de dosage de la LDH

Pour rappel, l'absorbance se mesure en fonction du rapport de l'intensité lumineuse du faisceau émis par le spectrophotomètre et de l'intensité transmise après passage dans l'échantillon (**Figure 48**) :

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Équation 4

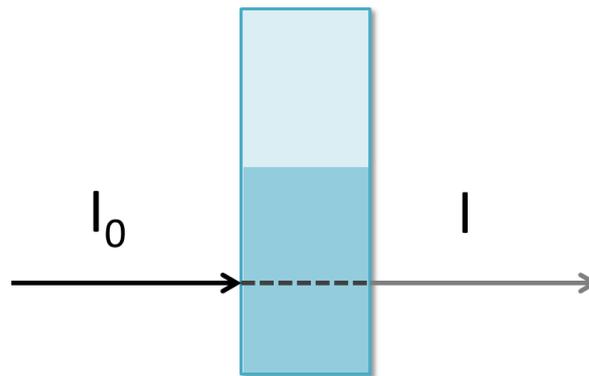


Figure 48 : Schéma de la mesure de l'absorbance. I_0 : intensité lumineuse émis par le spectroscope (à une longueur d'onde fixée), I : intensité transmise.

L'absorbance à 450 nm de suspensions de CNT bruts avec les réactifs du test a tout d'abord été mesurée en condition acellulaire pour les différentes doses de CNT utilisées dans nos études de cytotoxicité. Une augmentation dose-dépendante du signal a été détectée. Quatre dilutions de LDH ont été utilisées, afin d'obtenir une gamme d'absorbance englobant les résultats habituellement obtenus avec ce test (de 0,5 à 2, voir par exemple les résultats de l'article n°1 exprimés directement en unité arbitraire en **Figure 49**).

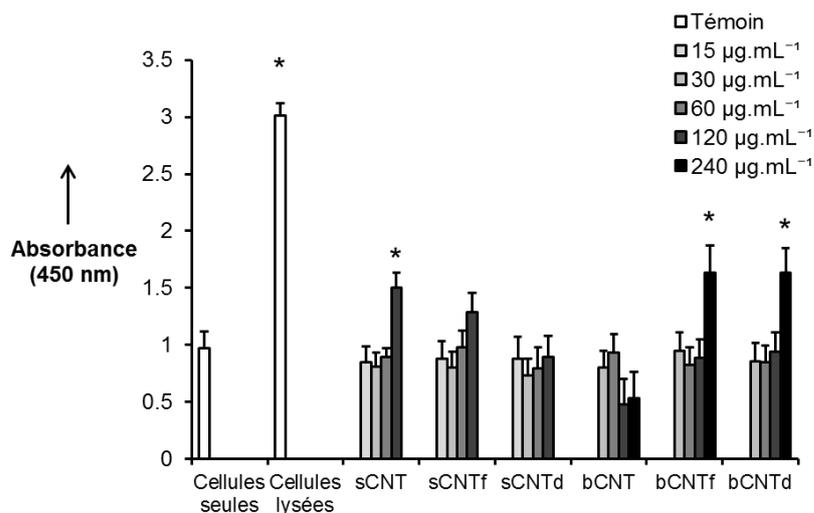


Figure 49 : Résultats classiques en absorbance obtenus avec le test de quantification de la LDH. Production de LDH après 24 h d'exposition à des CNT (article n°1).

1.2.3. Mise en évidence de biais pour le test LDH

Les résultats du test acellulaire sont présentés en **Figure 50**. En absence de LDH, nous pouvons remarquer que la seule présence des CNT a induit une augmentation de la valeur d'absorbance de manière dose-dépendante. Par ailleurs, l'ajout d'une faible dose de LDH (solution commerciale de cœur bovin à 0,8 U.µL⁻¹ fournie avec le kit à des dilutions de 1/14580 et 1/1620) n'a pas ou très peu influencé cette augmentation de l'absorbance due à la présence des CNT. Au contraire, à fortes concentrations de LDH (dilutions à 1/540 et 1/180), un comportement singulier est apparu. En effet, pour une plus forte concentration en LDH, les valeurs d'absorbance étaient significativement plus faibles pour les suspensions à 30 et 60 µg.mL⁻¹ de CNT, comparativement aux suspensions à 15 et 120 µg.mL⁻¹ de CNT ou au témoin sans CNT.

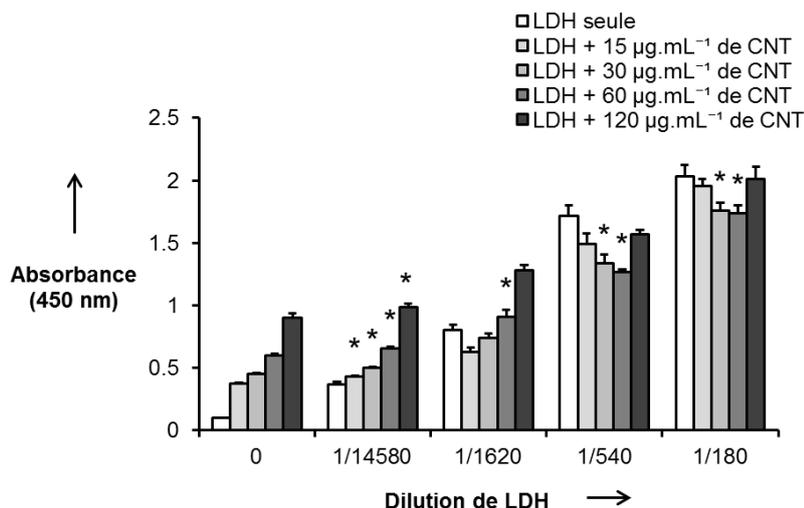


Figure 50 : Absorbance à 450 nm avec CNT bruts pour différentes dilutions de solution commerciale de LDH dans du milieu de culture. (* $p < 0,05$ test de Student. A la dilution 1/1620 $n=1$ et à la dilution 1/540 $n=2$ uniquement)

Pour mieux comprendre ce phénomène surprenant au premier abord, nous avons tout d'abord examiné plus en détail la capacité des CNT à présenter une absorbance intrinsèque dose-dépendante à 450 nm en absence de LDH. La **Figure 51** reprend les valeurs de l'absorbance des CNT en fonction de leur concentration sans ajout de LDH. La mesure a été effectuée dans du milieu de culture en présence de la solution contenant les réactifs du test ou dans du PBS uniquement. La capacité des CNT à présenter une réponse optique en absence de LDH ou des réactifs du test induit donc un biais dans la détection de la LDH. En effet, les CNT diffusent a priori la lumière incidente et induisent donc une extinction partielle du signal lumineux. L'évolution de l'absorbance due à la présence de CNT suit une loi linéaire, respectant bien la loi Beer-Lambert attendue :

$$A = \epsilon l C \quad \text{Équation 5}$$

A : absorbance, ϵ : le coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l : la longueur du trajet optique parcouru par le faisceau lumineux (cm), C : la concentration de la solution ($mol \cdot L^{-1}$).

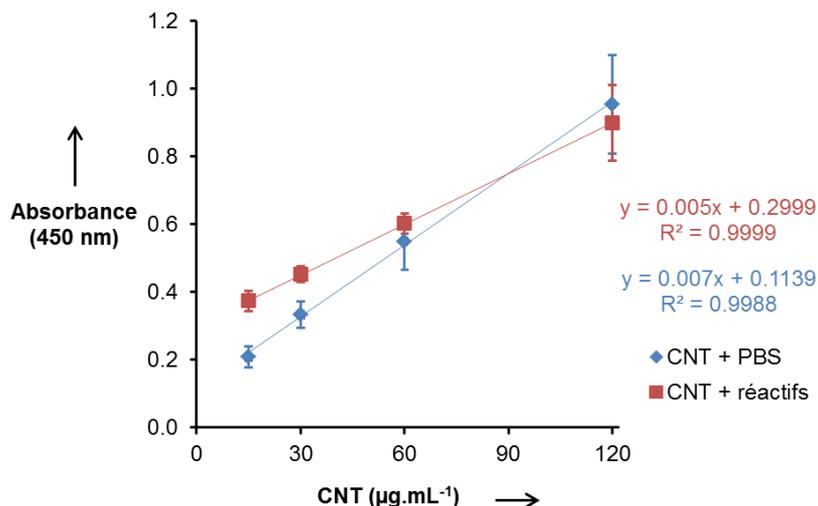


Figure 51 : Absorbance des CNT à 450 nm avec les réactifs du test LDH ou avec un équivalent en volume de tampon phosphate salin (PBS pour « phosphate buffered saline »).

De même, sur la **Figure 52**, nous pouvons observer également une loi linéaire de type Beer-Lambert pour le dosage de la concentration croissante de LDH en l'absence de CNT.

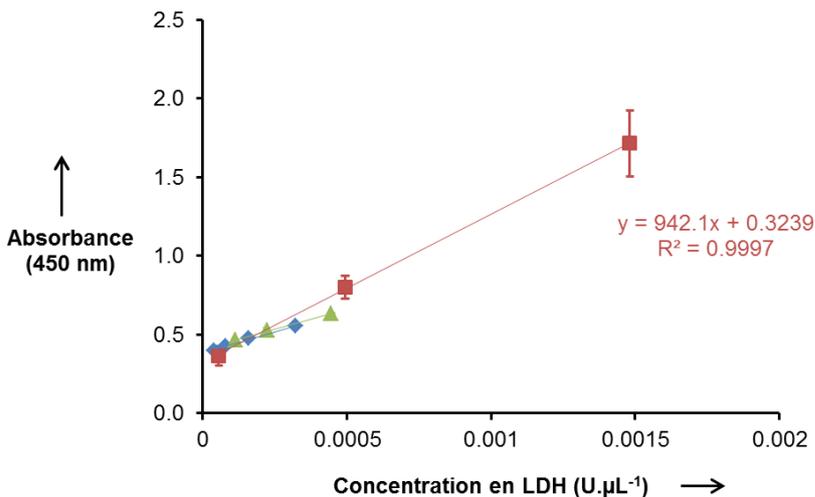


Figure 52 : Courbe étalon de l'absorbance à 450 nm en fonction de la concentration en LDH sans CNT.

Selon la théorie découlant de la loi de Beer-Lambert, l'absorbance du mélange de deux solutions est égale à la somme de l'absorbance de chacune de ces solutions (**Équation 6**). Or cela n'a pas été vérifié pour le mélange des solutions contenant de la LDH et des CNT (**Figure 53**). L'absorbance du mélange CNT + solution de concentration connue et fixée en LDH est inférieure à celle de cette solution contrôlée de LDH sans CNT. Le même phénomène a aussi été observé pour les autres dilutions de LDH (**Figure 54**).

$$A_{a+b} = \varepsilon_a l C_a + \varepsilon_b l C_b \tag{Équation 6}$$

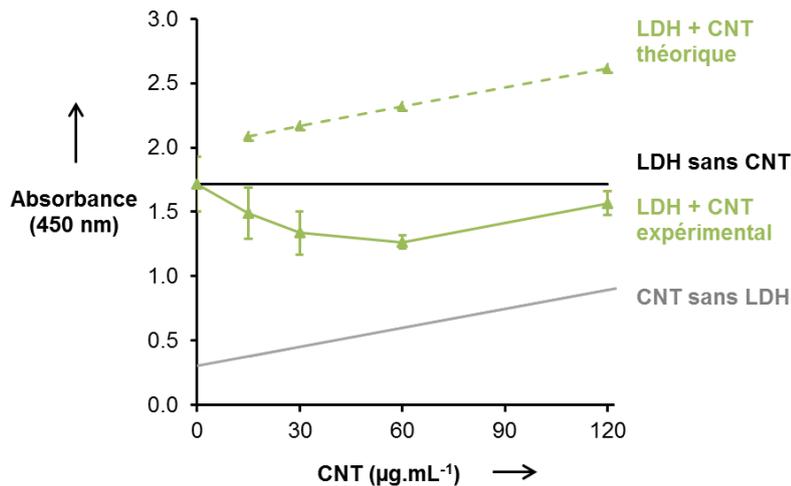


Figure 53 : Mise en évidence de la différence d'absorbances théoriques et expérimentales du mélange d'une dilution de LDH avec les suspensions de CNT. Dilution à 1/540 de la solution commerciale, soit $1,48 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

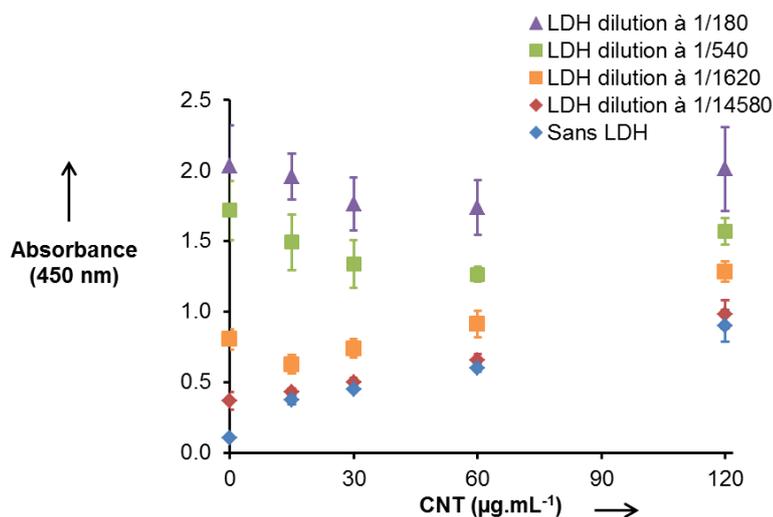


Figure 54: Evolution de l'absorbance du mélange CNT + LDH en fonction de la concentration en CNT

Nous avons émis l'hypothèse que ce comportement serait dû :

1. à une variation de la concentration en LDH induite par un biais d'adsorption de la LDH sur les CNT,
2. à un biais de nature optique induit par l'extinction partielle de la lumière due au caractère diffusant des CNT (**Figure 51**).

Il semble en effet qu'une partie de la LDH initialement introduite lors de nos tests en condition acellulaire s'adsorbe sur les CNT, abaissant de ce fait la concentration en LDH libre dans le milieu et pouvant être détectée en formant le sel de formazan. A partir de cette hypothèse, il est

possible de calculer à partir de l'absorbance du mélange de LDH et CNT et de la connaissance de l'absorbance de chacun de ces composés pris séparément, la quantité de LDH présente dans le milieu en fonction de la dose en CNT selon l'Équation 7 (Figure 55). On peut alors en déduire la quantité de LDH adsorbée sur les CNT par simple différence entre la LDH libre ayant formé le sel de formazan et la concentration initiale en LDH introduite (Figure 56).

$$n_{LDH \text{ libre}} = \frac{n_{LDH \text{ théorique}}}{A_{LDH \text{ théorique}}} \times (A_{\text{mélange LDH+CNT}} - A_{CNT}) \quad \text{Équation 7}$$

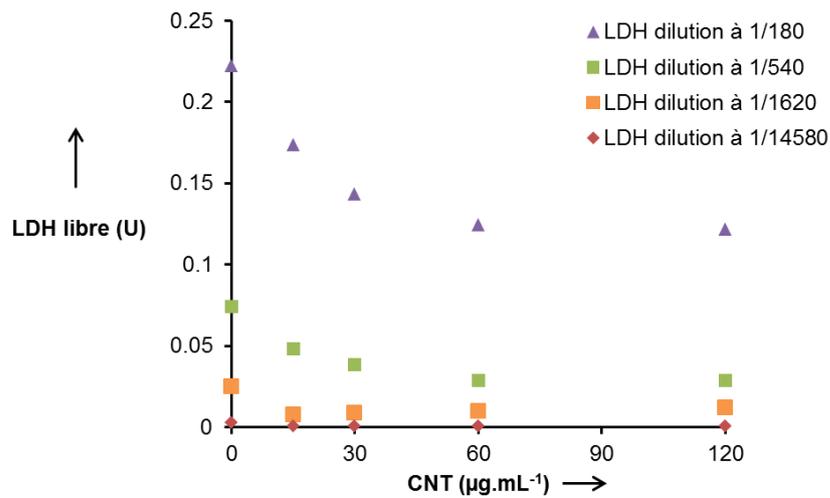


Figure 55 : LDH libre dans le milieu en fonction de la concentration en CNT, pour différentes concentrations initiales de LDH (dilutions de 1/180 à 1/14580 d'une solution commerciale à 0,8 U.µL⁻¹).

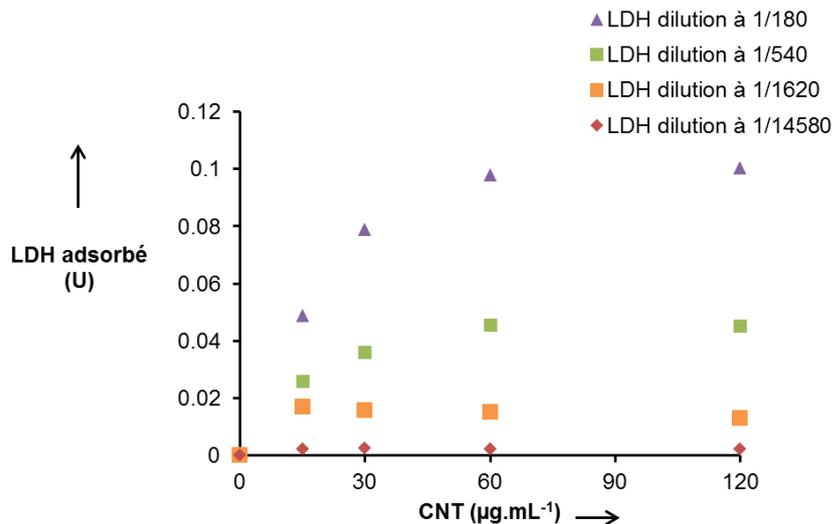


Figure 56 : LDH adsorbée sur les CNT, pour différentes concentrations initiales de LDH (dilutions de 1/180 à 1/14580 d'une solution commerciale à 0,8 U.µL⁻¹).

Un isotherme d'adsorption de la LDH sur les CNT a ensuite été tracé (**Figure 57**). Il représente la quantité de LDH adsorbée par masse de CNT en fonction de la quantité de LDH libre par masse de CNT. Les valeurs se superposent bien pour les différentes concentrations de LDH, confirmant ainsi notre hypothèse de l'existence de ce biais d'adsorption pour expliquer l'écart obtenu entre l'absorbance théorique du mélange CNT + LDH et la mesure expérimentale par spectrophotométrie. L'équilibre thermodynamique semble avoir bien été atteint, et l'hypothèse de l'adsorption de la LDH sur les CNT semble fondée. Nous avons décidé d'utiliser l'isotherme présentant les valeurs par masse de CNT (**Figure 57 A**). De manière logique, la tendance est identique avec les valeurs par surface de CNT (**Figure 57 B**).

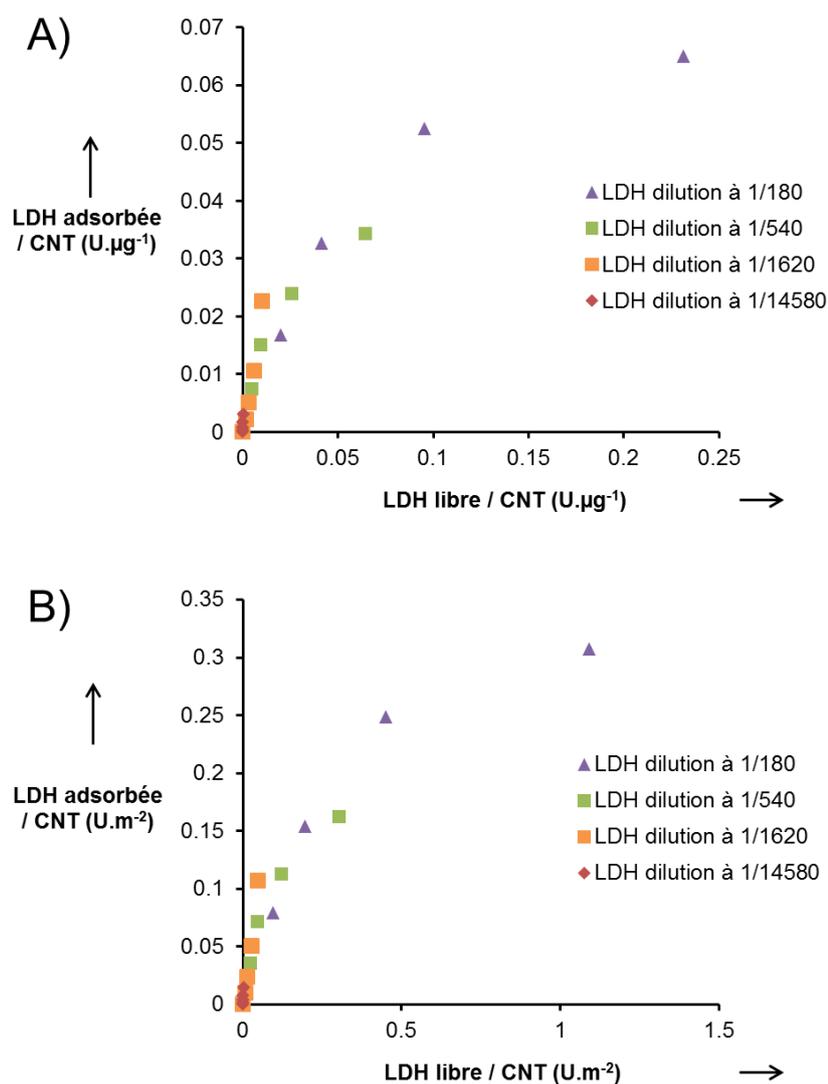


Figure 57 : Isotherme d'adsorption de la LDH sur les CNT pour différentes dilutions de la concentration commerciale en LDH (dilutions de 1/180 à 1/14580 d'une solution commerciale à 0,8 U.µL⁻¹) : A) présenté par quantité en masse en µg de CNT, B) présenté par surface en m² de CNT.

A partir de ces données expérimentales, la constante d'adsorption de la LDH sur les CNT peut être calculée après avoir appliqué un modèle d'adsorption. L'adsorption des protéines sur une surface est le plus souvent représentée par le modèle de Langmuir. Il modélise initialement l'adsorption réversible d'une monocouche de molécules de gaz sur une surface. L'Équation 8 en donne le modèle mathématique pour l'adsorption d'une protéine sur une surface.

$$n_{ads} = \frac{n_{eq} \times K_{ads} \times n_{libre}}{1 + K_{ads} \times n_{libre}} \quad \text{Équation 8}$$

Avec n_{ads} : quantité de protéines adsorbées par masse de solide, n_{eq} quantité maximale de protéines adsorbées par masse de solide, K_{ads} : constante d'adsorption, C concentration en protéines libres

L'équation est réadaptée pour normaliser les valeurs en fonction de la masse de CNT :

$$\frac{n_{ads}}{m_{CNT}} = \frac{\frac{n_{eq}}{m_{CNT}} \times K_{ads} \times n_{libre}}{1 + K_{ads} \times n_{libre}} \quad \text{Équation 9}$$

En posant $\alpha = K_{ads} \times m_{CNT}$ soit $K_{ads} = \frac{\alpha}{m_{CNT}}$ on obtient une nouvelle expression de l'équation de Langmuir qui correspond à notre isotherme en **Figure 57 A** :

$$\frac{n_{ads}}{m_{CNT}} = \frac{\frac{n_{eq}}{m_{CNT}} \times \alpha \times \frac{n_{libre}}{m_{CNT}}}{1 + \alpha \times \frac{n_{libre}}{m_{CNT}}} \quad \text{Équation 10}$$

Une régression linéaire est ensuite effectuée afin de déterminer les constantes α et n_{eq} :

$$\frac{n_{libre}/m_{CNT}}{n_{ads}/m_{CNT}} = \frac{1}{\frac{n_{eq}}{m_{CNT}} \times \alpha} + \frac{n_{libre}/m_{CNT}}{\frac{n_{eq}}{m_{CNT}}} \quad \text{Équation 11}$$

La droite obtenue est présentée en **Figure 58**. Les constantes peuvent alors être calculées : on a $\frac{1}{\frac{n_{eq}}{m_{CNT}} \times \alpha} = 14,304$ et $\frac{1}{\frac{n_{eq}}{m_{CNT}} \times \alpha} = 0,4746$ donc $\frac{n_{eq}}{m_{CNT}} = 0,07$ et $\alpha = 30,14$ et Le modèle de Langmuir semble bien correspondre à nos données expérimentales (**Figure 59**). D'autres modèles ont été testés mais n'ont pas donné des résultats satisfaisants (**Figure 60**).

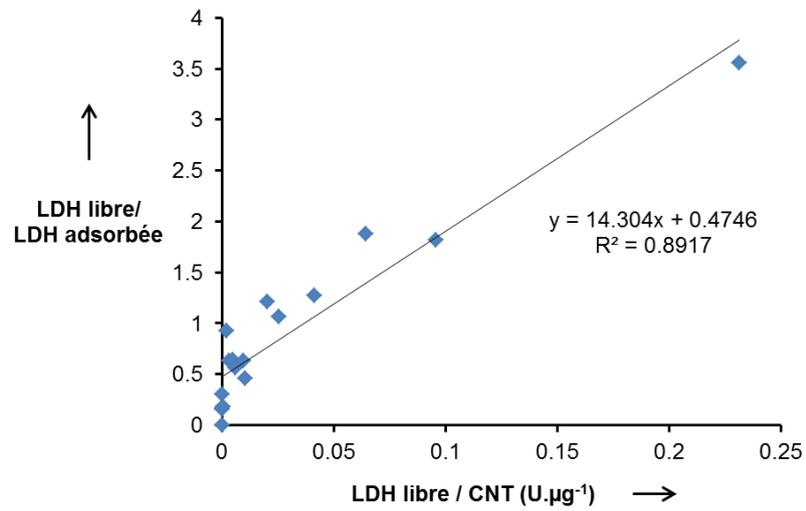


Figure 58 : Régression linéaire pour la détermination des paramètres du modèle de Langmuir.

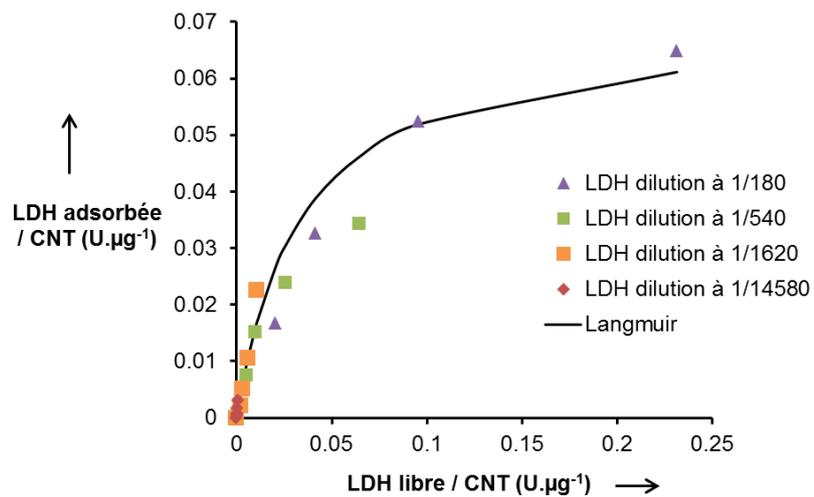


Figure 59 : Isotherme d'adsorption de la LDH sur les CNT avec la courbe du modèle de Langmuir après calcul des paramètres ($n_{eq}/m_{CNT}=0,7$ et $\alpha=30,14$).

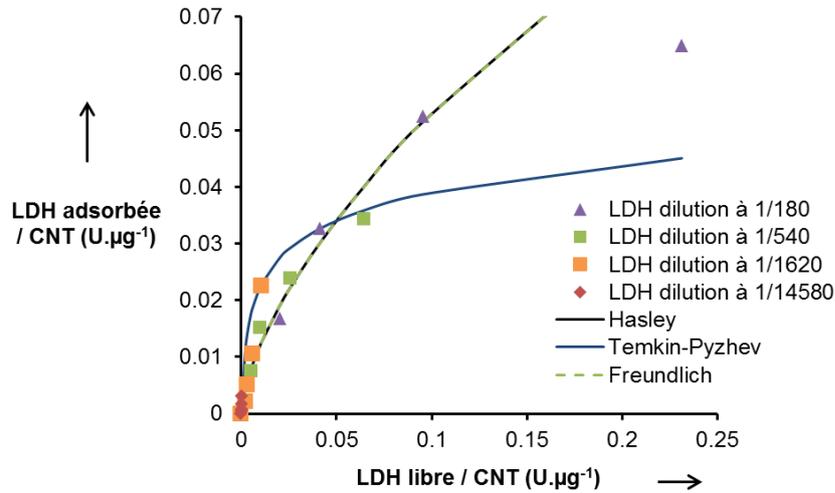


Figure 60 : Isotherme d'adsorption de la LDH sur les CNT avec les courbes des modèles Hasley, Temkin-Pyzhev et Freundlich.

En combinant l'Équation 6 et l'Équation 8, on obtient l'expression permettant d'obtenir la concentration en LDH réellement contenue dans la solution :

$$n_{LDH} = n_{libre} + n_{ads}$$

$$n_{LDH} = V \times C_{libre} + \frac{n_{eq} \times K \times V \times C_{libre}}{1 + K \times V \times C_{libre}}$$

$$C_{LDH} = \frac{n_{LDH}}{V} = C_{libre} + \frac{n_{eq} \times K \times C_{libre}}{1 + K \times V \times C_{libre}}$$

$$C_{LDH} = \frac{A_{mélange} - A_{CNT}}{\varepsilon_{LDH} \times l} + \frac{n_{eq} \times K \times (A_{mélange} - A_{CNT})}{(\varepsilon_{LDH} \times l) \times (1 + K \times V \times \frac{A_{mélange} - A_{CNT}}{\varepsilon_{LDH} \times l})}$$

Avec $K = \frac{\alpha}{m_{CNT}}$ et en n'oubliant pas que nous avons la valeur de n_{eq}/m_{CNT} :

$$C_{LDH} = \frac{A_{mélange} - A_{CNT}}{\varepsilon_{LDH} \times l} + \frac{n_{eq} \times \frac{\alpha}{m_{CNT}} \times (A_{mélange} - A_{CNT})}{\varepsilon_{LDH} \times l + \frac{\alpha}{m_{CNT}} \times V \times (A_{mélange} - A_{CNT})} \quad \text{Équation 12}$$

Il est ainsi possible de déterminer la concentration réelle de LDH contenue dans le milieu extracellulaire, après avoir calculé les constantes d'adsorption par l'utilisation d'un test

acellulaire. Par exemple, nous avons appliqué l'Équation 12 sur les résultats du Chapitre 2 pour les CNT petits et bruts (Figure 61). La différence avant-après correction est comprise entre 9 et 12%, et seule la valeur pour $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CNT est significativement différente du témoin avant comme après correction.

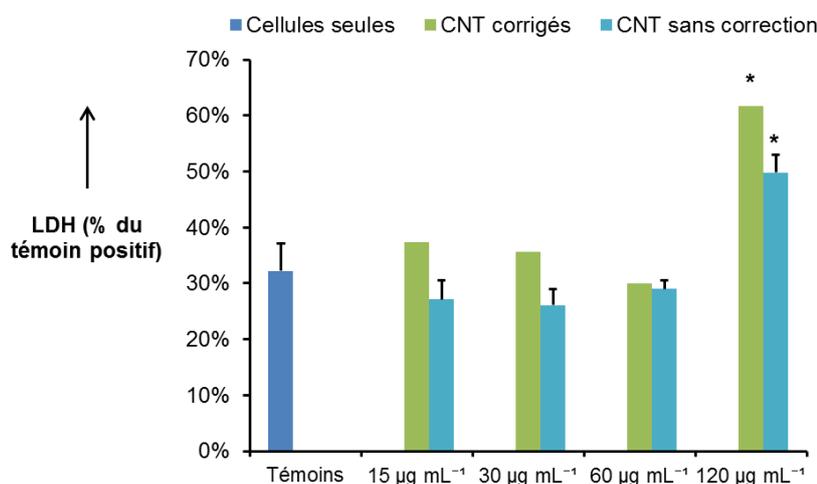


Figure 61 : LDH corrigée et non corrigée pour les macrophages exposés 24 h aux sCNT. * $p < 0,05$ significativement différent du témoin négatif (test de Student)

1.2.4. Conclusion sur les biais du test LDH

Nous avons vérifié la présence de deux biais sur le test LDH :

- biais de nature optique : surestimation des valeurs de LDH due à l'absorbance intrinsèque des CNT à la longueur d'onde cible du test (450 nm),
- biais de nature physico-chimique : sous-estimation des valeurs de LDH due à l'adsorption de la LDH en surface des CNT.

L'étude de Holder et al. (2012) a aussi démontré une interaction entre la LDH et des particules de carbone activé et de suie. Une formule permettant de corriger ces biais a été proposée. Il faut toutefois noter que les deux biais potentiellement en cause se compensent en partie (augmentation de l'absorbance due à l'absorption des CNT et diminution due à l'adsorption de la LDH sans les CNT). De ce fait, l'interférence finale demeure faible, notamment comparée aux biais obtenus pour le test ROS, et ne doit pas remettre en cause la significativité des résultats obtenus. Ils n'ont ainsi pas modifié les tendances de cytotoxicité pour l'exemple issu de l'article n°1. L'adsorption de la LDH sur les CNT dépend sûrement des caractéristiques physico-chimiques de surface des CNT, notamment du taux de défauts de structure et de la fonctionnalisation éventuelle. Les isothermes d'adsorption devraient donc rigoureusement être recalculés pour chaque type de CNT.

II. Etude approfondie sur les espèces oxydantes par cytométrie en flux

II.1. Objectifs et méthodologie

Le stress oxydant est un processus cellulaire particulièrement complexe. Notre test fluorimétrique en plaque permet d'en avoir une vue d'ensemble en quantifiant une activité radicalaire large spectre. Afin de mieux appréhender ce phénomène et l'action des CNT, une étude plus rigoureuse est en cours de réalisation au sein du laboratoire.

La cytométrie en flux a été choisie comme technique préférentielle permettant une étude multiparamétrique et quantitative du stress oxydant (voir Annexe A1.3.7.). En effet, elle permet de combiner l'analyse de plusieurs marqueurs fluorescents permettant l'analyse simultanée de plusieurs types de radicaux libres. De plus, les biais induits par la présence de CNT sont limités car un fenêtrage permet d'exclure les déchets et notamment les CNT libres restant dans la suspension cellulaire. Un deuxième fenêtrage basé sur une coloration à l'iodure de propidium (IP) exclut par ailleurs les cellules mortes, permettant une analyse ciblée uniquement sur les cellules viables. L'IP est en effet un intercalant passif de l'ADN ne pouvant pénétrer qu'au sein des cellules dont la membrane est endommagée. Quatre sondes fluorescentes ont été associées :

1. Le DCFH-DA (ex/em : 495/527nm), utilisé pour notre test classique qui quantifie les ROS de façon globale, et représente notre sonde référente pour le stress oxydant.
2. Le CellROX-Green (ex/em : 485/520nm) quantifie les radicaux hydroxyles (OH^\bullet).
3. L'hydroéthidine (HE) (ex/em : 518/606nm) quantifie les anions superoxydes (O_2^\bullet).
4. L'hydroxyphényl fluorescéine (HPF) (ex/em : 490/515nm) quantifie les peroxy-nitrites (ONOO^\bullet).

Le spectre d'émission de l'HE se superposant à celui de l'IP, pour ce fluorophore, les cellules mortes sont donc éliminées en fenêtrant uniquement sur les paramètres de morphologie (FSC « forward scatter channel » et SSC « side scatter channel »). Pour les autres fluorophores, des compensations sont utilisées afin de soustraire les superpositions des spectres de réémission.

Seules les doses extrêmes en CNT ont été utilisées (15 et $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pour cette étude spécifique du stress oxydant par cytométrie. Les analyses ont été réalisées après 90 min d'exposition de macrophages murins (RAW 264.7) aux CNT comme dans nos études précédentes, mais aussi après 24 h pour voir l'évolution du stress oxydant sur une période de contact plus longue. Trois types de MWCNT ont été utilisés : CNT bruts (Chapitre 3), CNTa recuits à 2125°C 1 h sous Ar (Chapitre 3), et CNTf fonctionnalisés à l'acide (basé sur un protocole légèrement modifié des Chapitres 2 et 4).

II.2. Production de radicaux libres

II.2.1. ROS large spectre

Une production significative de ROS a été détectée à $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les 3 types de CNT, à 90 min uniquement (**Figure 62**).

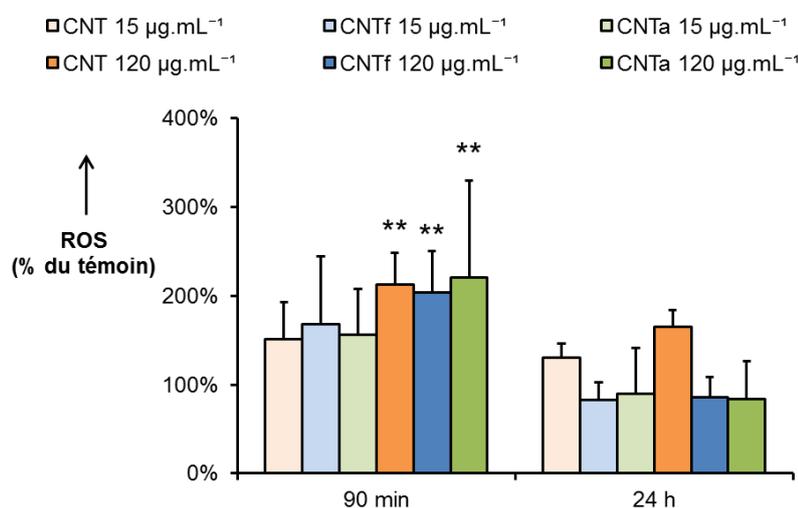


Figure 62 : Production de ROS analysée en cytométrie en flux (sonde DCFH-DA), après exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf). **: significativement différent du témoin $p < 0,01$ test ANOVA et test de Bonferroni.

II.2.2. Radicaux hydroxyles

Tous les types de CNT ont entraîné de façon assez surprenante une diminution de la production d' OH^\bullet par rapport au témoin négatif (cellules seules). L'effet est significativement plus important pour la plus forte dose de $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La fonctionnalisation ou le recuit haute température semblent accentuer cette diminution de la production d' OH^\bullet . Pour les CNT bruts uniquement, la quantité d' OH^\bullet décroît au bout de 24 h.

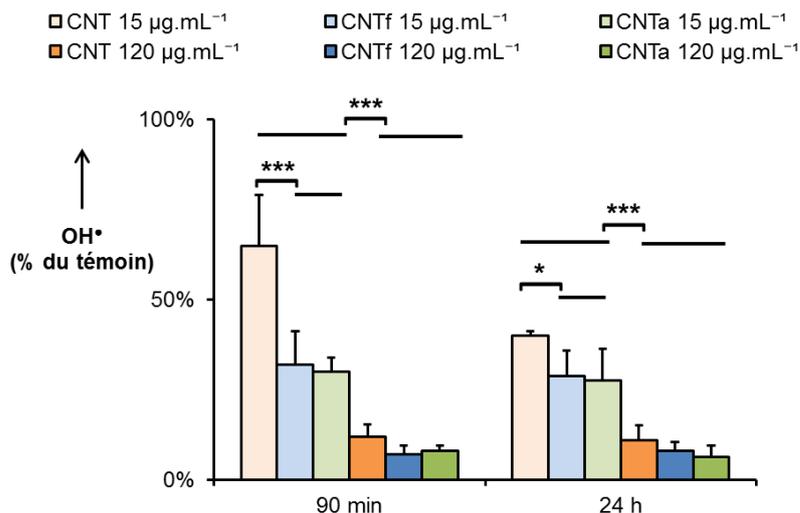


Figure 63 : Production de radicaux hydroxyles analysée en cytométrie en flux (sonde CellROX green), induite par une exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement différent $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$, test ANOVA et test de Bonferroni.

II.2.3. Anions superoxydes

De façon particulière et isolée, seuls les CNTf ont induit une production significative de $O_2^{\bullet-}$ sans effet de dose (15 vs 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou de temps (90 min vs 24 h), par rapport à la condition témoin ou aux conditions avec exposition aux CNT et CNTa (**Figure 64**).

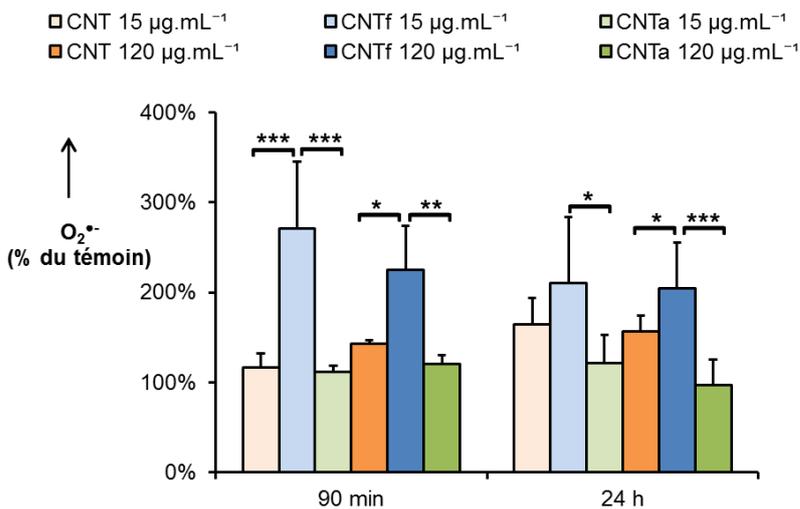


Figure 64: Production d'anions superoxydes analysée en cytométrie en flux (sonde HE), induite par une exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement différent $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, test ANOVA et test de Bonferroni.

II.2.4. Peroxynitrites

Aucune production significative d'ONOO• n'a été observée quels que soient la dose, la durée d'exposition et le type de CNT (**Figure 65**).

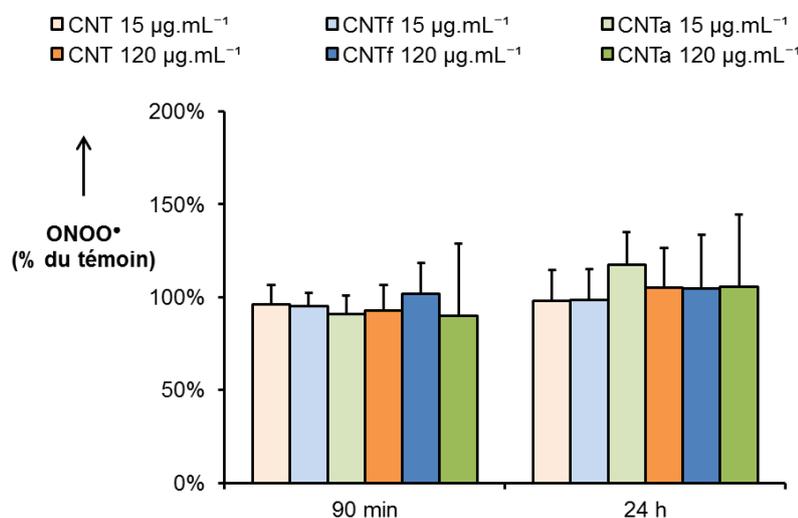


Figure 65 : Production de peroxynitrites analysée en cytométrie en flux (sonde HPF), induite par une exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf).

II.3. Discussion autour de l'étude des radicaux libres

Il peut paraître surprenant que l'étude de la production de ROS large spectre par cytométrie en flux ait abouti à des valeurs de production radicalaire plus faibles que celles obtenues avec notre test fluorimétrique en plaque avec des niveaux de ROS de 2 à 50 fois plus élevés que le témoin négatif (voir Chapitre 2 et 3). Néanmoins, la cytométrie en flux prend exclusivement en compte la population cellulaire viable et non pas la population globale qui est sans doute plus hétérogène. En outre cette technique ne considère que les ROS intracellulaires. Nos résultats en plaque suggèrent une présence importante des ROS et du DCF en milieu extracellulaire. Les ROS peuvent en ce cas être produits intrinsèquement par les CNT, et/ou être relargués par les macrophages comme c'est le cas suite à une explosion oxydative (Olahanmi et al. 1993; Caldefie-Chézet et al. 2002). Les deux techniques : en plaque et par cytométrie en flux, n'évalueraient donc pas le même mécanisme de production de ROS (l'un prenant en compte les ROS d'origine cellulaire uniquement, et le second les ROS d'origine cellulaire ou particulaire).

En outre, aucune diminution du stress oxydant n'a été visible après fonctionnalisation acide ou recuit haute température. Pour les CNTa comparés aux CNT bruts, nous n'avons pas observé de diminution par test fluorimétrique sur plaque non plus. Pour ce lot de CNTf, nous avons aussi réalisé un test classique sur plaque et n'avons pas détecté de diminution après

fonctionnalisation (voir en annexe A2. Différences entre les deux lots de CNT fonctionnalisés à l'acide).

Par ailleurs, la production d'OH• est apparue, de façon plutôt surprenante, réduite après exposition des macrophages aux CNT, de façon plus marquée pour les CNTf et CNTa par rapport aux CNTb. Cela pourrait s'expliquer par l'implication d'un mécanisme antioxydant soit de nature cellulaire ou directement provoqué intrinsèquement par les CNT eux-mêmes (effet antioxydant acellulaire).

Une étude complémentaire a été réalisée sur deux systèmes antioxydants non spécifiques. Aucune activation de la SOD (superoxyde dismutase), molécule antioxydante, n'a été détectée (résultats non illustrés). En revanche, l'activité de la catalase (enzyme antioxydante catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène) est apparue en forte hausse notamment après 90 min d'exposition des cellules aux CNT (5 à 6 fois supérieure au témoin négatif **Figure 66**). Cela signifie, qu'un mécanisme rapide antioxydant est en effet initié par la présence des CNT et le stress oxydant produit. D'autres voies que la catalase et la SOD pourrait éventuellement prendre le relai de ce mécanisme à plus long terme, expliquant les valeurs obtenues pour 24h de contact. Ces résultats n'expliquent toutefois pas la réduction spécifique d'OH•. Du fait de la non-spécificité de la catalase, d'autres espèces radicalaires devraient présenter des faibles niveaux de production.

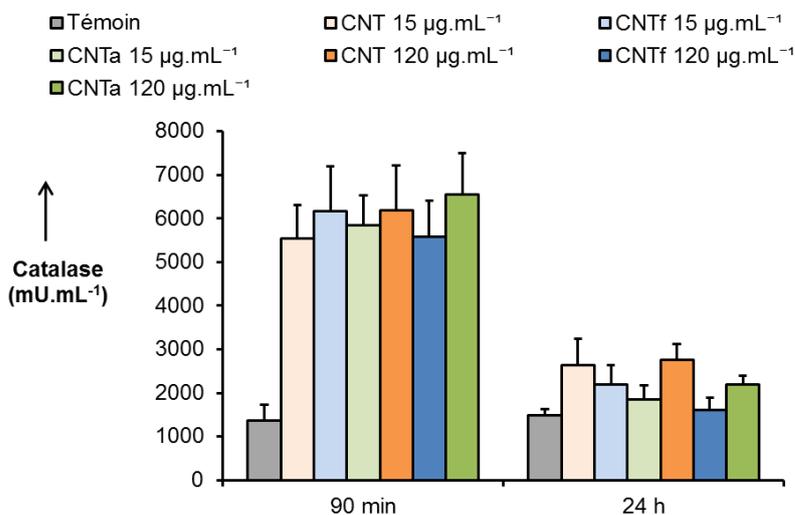


Figure 66 : Activité de la catalase induite par une exposition de macrophages à des nanotubes de carbone bruts (CNT), recuits à 2125°C (CNTa) ou fonctionnalisés à l'acide (CNTf). Dosage par le kit Amplex Red Catalase (Molecular Probes).

La diminution d'OH• pourrait provenir d'un effet « scavenger » des CNT. D'après les résultats obtenus, il y a un effet inversement proportionnel à la dose pour les CNTf et CNTa, mais sans effet temps. Cet activité « scavenger » pourrait augmenter avec le taux de défauts

structuraux , en accord avec certaines données de la littérature (Galano et al. 2010; Shukla & Mishra 2010). Fenoglio et al. (2006) ont de plus montré une activité scavenger spécifique des CNT pour les radicaux OH^\bullet . Cette hypothèse pourrait donc expliquer que les CNTf aient diminué la quantité d' OH^\bullet de manière plus importante que les CNT bruts. Toutefois, les CNTa, qui présentent moins de défauts de structure, ont eux aussi abaissé la concentration d' OH^\bullet de manière équivalente à celle des CNTf. A ce jour, la littérature ne propose aucun lien clair entre d'autres paramètres physico-chimiques et l'activité « scavenger » des CNT. Des études complémentaires, notamment des mesures au RPE, devraient permettre d'éclaircir ce point quant à la capacité « scavenger » intrinsèque potentielle des 3 types de CNT utilisés.

Par ailleurs, la fonctionnalisation acide semble induire spécifiquement une production d' O_2^\bullet . Comme aucune différence n'a été détectée entre les CNT bruts et les CNTa, nous pouvons conclure que ni la purification des impuretés catalytiques, ni le taux de défauts de structure ne semblent influencer la production de ce radical. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que la production d'anions superoxydes est favorisée uniquement par la présence de groupements acides en surface, que ce soit par une réactivité directe de ces groupements, par le biais d'une modification des protéines adsorbées en surface selon le concept « corona » (Kapralov et al. 2012), ou à cause d'une meilleure dispersibilité de ces CNTf, favorisant les contacts cellules/particules (Wang et al. 2010).

Enfin, aucune production d' ONOO^\bullet n'a été détectée. La voie des radicaux libres dépendante de l'azote ne semble donc pas intervenir dans la production de stress oxydant pour nos conditions expérimentales, lors d'exposition de cellules RAW 264.7 à des CNT.

Le stress oxydant, associé à une réponse inflammatoire chronique, peut mener à la destruction des tissus et à l'initiation d'un processus cancérigène. Au vu des résultats de stress oxydant et de la réponse pro-inflammatoire après une exposition *in vitro* aigüe, la question de la génotoxicité des CNT s'est donc aussi naturellement posée. Un test TUNEL (kit A35127, Molecular Probes®) a été également appliqué sur des conditions expérimentales similaires pour trois types de CNT. Ce test permet de détecter la fragmentation internucléosomale de l'ADN, signe d'une mort cellulaire de type apoptose. Un polymère (le 5-bromo-2'-deoxyuridine5'-triphosphate) se fixe sur les extrémités hydroxyles libres de l'ADN ; et un anticorps spécifique de ce polymère couplé à un fluorophore (Alexa Fluor®488, ex/em : 495/519nm) permet de quantifier l'endommagement de l'ADN. Aucune fragmentation significative de l'ADN n'a été détectée quels que soient la dose, la durée d'exposition et le type de CNT (données non illustrées). Les CNT semblent donc ne pas générer d'apoptose ce qui corrobore nos observations précédemment illustrées de cytotoxicité. Cependant, d'autres études utilisant différents tests (micronoyaux, test des comètes) ont observé une génotoxicité après exposition de la même lignée de macrophages à des CNT (Di Giorgio et al. 2011; Migliore et al. 2010).

Une analyse complémentaire a été effectuée sur les résultats du test TUNEL après avoir constaté des différences de profil au niveau de la répartition des phases du cycle cellulaire, après incorporation d'IP (Figure 67). Les cellules sont perméabilisées pour le test TUNEL, l'IP peut donc pénétrer dans le cytoplasme des cellules et se fixer sur l'ADN de celles-ci. Analyser ses profils de fluorescence permet d'avoir des indications sur la compaction de l'ADN et le cycle cellulaire. Les deux pics classiques de fluorescence correspondent aux cellules en phase G0/G1 (phase stable et de préparation à la synthèse) et G2/M (phase de préparation à la division cellulaire et mitose). Le pic correspondant à la phase G0/G1 constitue un témoin de l'accessibilité de l'IP à l'ADN et donc de sa décompaction. Après une exposition aux CNT, la distinction entre les deux pics est abolie avec un élargissement des pics se traduisant par une augmentation du coefficient de variation à la moyenne. La tendance semble plus prononcée à 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ qu'à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les moyennes et les écart-types des pics G0/G1 sont présentés en **Tableau 8** pour chaque type de CNT. Nous n'avons pas observé de différence significative au niveau de la moyenne d'intensité des pics, par contre une différence significative des coefficients de variation comparés au témoin a été observée pour toutes les conditions avec CNT (à part 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CNT bruts). Il semblerait donc que les CNT influencent la décompaction de l'ADN et aient donc un effet génotoxique sans aller jusqu'au déclenchement d'une fragmentation des brins d'ADN.

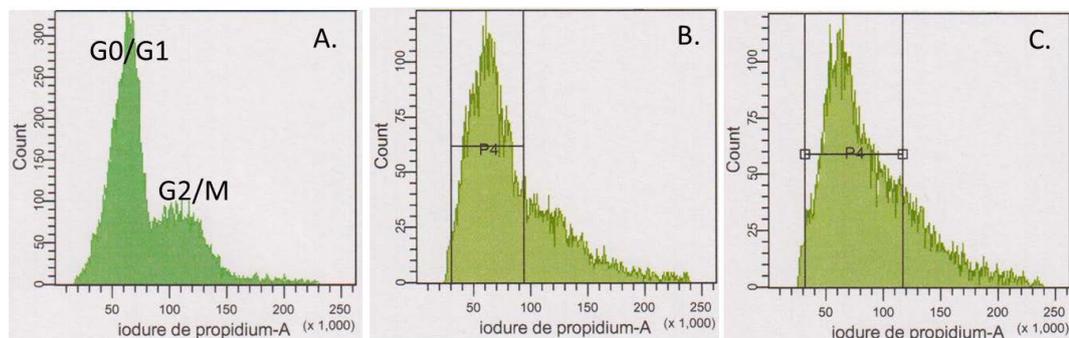


Figure 67 : Profil des pics d'iodure de propidium en fonction du nombre d'événements (nombre de cellules) pour A) les cellules seules, B) les cellules traitées 90 min avec 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CNT bruts et C) les cellules traitées 90 min avec 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CNT bruts.

Tableau 8 : Paramètres du pic G0/G1, indicateurs de la décompaction de l'ADN.

	Rapport moyenne géométrique avec CNT/sans CNT	Rapport coefficient de variation avec CNT/sans CNT
CNT 15 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	1,16	1,28
CNT 120 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	1,08	1,54
CNTf 15 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	1,02	1,37
CNTf 120 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	0,99	1,79
CNTa 15 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	1,14	1,44
CNTa 120 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	0,96	1,85

En conclusion, les CNT semblent induire un stress oxydant mettant en jeu uniquement certaines espèces radicalaires dépendamment des propriétés de surface des CNT (modifiées par fonctionnalisation acide, ou traitement thermique notamment). Une activité antioxydante est elle aussi mise en jeu, activée au sein de la cellule notamment via la catalase, mais peut-être aussi de manière physique par adsorption des radicaux sur les CNT (activité « scavenger »). Enfin, si aucun signal d'apoptose et de fragmentation de l'ADN n'a été observé, un effet sur la décompaction de l'ADN semble pouvoir être induit par les CNT, compatible avec un effet génotoxique potentiel à confirmer sur des durées d'expositions plus longues.

BILAN CHAPITRE 5 : Etudes exploratoires

Ce chapitre a fait état des études complémentaires réalisées, ou en cours de réalisation, sur les interférences entre les CNT et les tests classiques de toxicité, et sur le stress oxydant. Nous avons vu qu'une sous-estimation des concentrations en TNF- α serait possible, mais n'aurait *a priori* pas d'impact majeur sur la significativité de nos données. Une étude de ces biais serait nécessaire afin de pouvoir confirmer leur présence et leur importance. En outre, la présence de CNT fausse les résultats de dosage de la LDH, d'une part à cause de l'absorbance intrinsèque des CNT, et d'autre part à cause de l'adsorption de la LDH en surface des CNT. Les biais finaux sont faibles, mais une correction serait tout de même nécessaire afin d'être rigoureux. De nouveaux essais avec d'autres types de CNT doivent être envisagés afin de mieux appréhender ce phénomène.

L'étude plus poussée du stress oxydant par cytométrie en flux a permis de confirmer la génération d'un stress oxydant par les macrophages après exposition à des CNT. Cette approche multiparamétrique a permis de souligner que la fonctionnalisation acide semble favoriser la production d'anions superoxydes. Les radicaux dépendant de l'azote ne semblent pas être mis en jeu. Un effet « scavenger » intrinsèque aux CNTf et CNTa, qui reste à démontrer et étudier, pourrait entraîner une diminution ciblée du taux de radicaux hydroxyles. Des études complémentaires en RPE et des cinétiques d'exposition sont prévues afin d'approfondir l'étude de ce paramètre de stress oxydant, qui demeure encore très peu évalué dans les études de nanotoxicologie.

Des tests supplémentaires sur l'étude de la cytotoxicité sont également en cours de réalisation afin d'apporter des précisions sur les mécanismes de mort cellulaire et de génotoxicité, ou d'altération du métabolisme mitochondrial témoin « de la souffrance cellulaire ».

Ces travaux mèneront à la rédaction de deux nouvelles publications scientifiques au cours de l'année 2015.

Conclusion

La toxicité des CNT est au cœur de nombreuses études depuis leur découverte relativement récente. Cependant, un bilan bibliographique nous a permis de constater qu'il n'existait pas une toxicité unique de ces nanomatériaux. Leurs impacts biologiques variant en effet avec leurs caractéristiques physicochimiques, il est très difficile de proposer une toxicité prédictive pour les CNT, compte tenu de l'hétérogénéité de type, structure, longueur... L'approche « safer by design » propose d'identifier les choix des caractéristiques physicochimiques à retenir dès la conception des CNT, afin de proposer *a priori* un impact toxicologique le plus faible possible sur la santé humaine.

Au cours de cette thèse, deux traitements de post-production, étant utilisés à l'échelle industrielle, ont été étudiés (voir résumé des résultats en **Tableau 9**). Ni la fonctionnalisation acide, ni le recuit haute température ne sont apparus comme des solutions suffisantes, voire souhaitables, afin de minimiser les effets toxiques *in vitro* étudiés sur une lignée de macrophages. La fonctionnalisation acide de CNT est souvent présentée comme un processus permettant, au moins partiellement, de limiter la toxicité et la biopersistance des CNT. La diminution de l'hydrophobicité et la purification des CNT qu'elle entraîne, est de plus intéressante pour les applications industrielles et pour de nouvelles applications pharmacologiques. Nous avons montré, qu'elle n'a que peu d'impact sur la cytotoxicité, qu'elle diminue certes le stress oxydant si celui-ci était déclenché par les CNT bruts, mais que, d'un autre côté, elle augmente la réponse pro-inflammatoire. Des résultats similaires ont été observés après la fonctionnalisation acide de NG. En revanche, si, comme le CB étudié, les nanomatériaux bruts à base de carbone n'entraînent aucune réponse pro-inflammatoire, il est dans ce cas possible qu'elle ne soit pas déclenchée par une fonctionnalisation acide. Ce traitement de surface pourrait alors s'avérer approprié pour diminuer la toxicité des CNT. Le recuit haute température des CNT permet également de purifier les CNT, mais aussi de diminuer leur taux de défauts de structure. Ce traitement a lui aussi déclenché une réponse pro-inflammatoire plus importante, mais n'a pas eu d'impact significatif sur le stress oxydant et la cytotoxicité. Il ne semble donc pas constituer une piste prometteuse pour une approche « safer by design ».

Néanmoins, l'étude des impacts biologiques de ces traitements nous a apporté des pistes de compréhension de la toxicité *in vitro* des CNT. La présence de groupements acides en surface des CNT ou des NG, semble être à l'origine d'une augmentation de la réponse pro-inflammatoire. Cela pourrait être dû aux changements de chimie de surface, entraînant une modification de la couche de protéines adsorbées, la « corona » protéique, ou l'augmentation de la dispersion donc de la surface disponible des CNT. Dans le Chapitre 1 nous avons suggéré que la purification des impuretés catalytiques entraînait une diminution du stress oxydant. Cela est en accord avec la littérature, qui fait état d'un lien entre métaux et stress oxydant, notamment par le biais de la réaction de Fenton. Toutefois, la purification par recuit des CNT n'a pas entraîné de baisse du stress oxydant. De la même manière, des nanomatériaux purifiés comme le CB, ou les CNT et NG fonctionnalisés ont la capacité d'induire un stress oxydant.

Celui-ci n'est donc pas dû uniquement à la présence d'impuretés métalliques, mais aussi à l'interaction nanomatériaux/cellules ou à la production intrinsèque de radicaux libres par ces nanomatériaux. Nous avons, en outre, supposé que la cristallinité des CNT jouait un rôle prépondérant dans les mécanismes de stress oxydant. L'activité « scavenger » des CNT, qui entraîne une diminution de la concentration en radicaux libres dans le milieu, serait accrue par les défauts de structure. La fonctionnalisation acide, augmentant le taux de défauts structuraux, favoriserait ainsi une baisse du stress oxydant. Au contraire, l'amélioration de la cristallinité par un recuit haute température viendrait contrebalancer l'effet de la purification des CNT.

Une étude plus poussée du stress oxydant a permis de confirmer la production de diverses catégories radicalaires dépendantes de l'oxygène et non de l'azote, par les CNT. Les radicaux hydroxyles sembleraient liés à l'activité « scavenger » dont nous avons fait l'hypothèse. Cette étude a, de plus, mis en exergue une nouvelle question autour du lien entre groupements acides de surface et la production d'anions superoxydes. De nouvelles techniques utilisant la cytométrie en flux sont en cours de développement, et pourront permettre par ailleurs une étude approfondie de la cytotoxicité. En effet, dans nos trois études, seule une cytotoxicité faible était déclenchée par les CNT. Les CNT semblent donc entraîner une faible réponse cytotoxique, peu influencée par les post-traitements. Néanmoins, nous avons vu que le dosage de la LDH pouvait être biaisé par la présence de CNT. Il est de plus possible que le test LDH manque de sensibilité. L'utilisation de tests complémentaires de cytotoxicité pourrait renforcer notre compréhension de cette réponse cellulaire. Dans ce contexte l'utilisation spécifique de sondes fluorescentes dédiées à la cytométrie sont envisagées, telles que le DiOC6 qui rend compte de l'état de la respiration mitochondriale et donc de la vitalité ou souffrance cellulaire.

Tableau 9 : Résumé de la réponse cellulaire des CNT en fonction de leurs principales caractéristiques physicochimiques : - : nulle, + : modérée, ++ : importante, +++ très importante, / : non mesurée, * : non cristallisés donc Id/Ig peu fiables. CNT : nanotubes de carbone, CB : noir de carbone, NG : nano-graphite, s : small, b : grand, f : fonctionnalisés à l'acide, d : désorbés après fonctionnalisation.

	Diamètre (épaisseur pour les NG) (nm)	Défauts de structure, Id/Ig	Fonctionnalisation acide, oxygène (% atomique)	Pureté, Fe et Al (%m.)	Cytotoxicité, LDH	Réponse pro-inflammatoire, TNF- α	Stress oxydant, ROS
sCNT	23 \pm 4	0,82	2	0,15 et 4,83	+	+	+++
sCNTf	16 \pm 5	1,83	13	0,05 et 0,03	-	++	++
sCNTd	15 \pm 4	1,76	/	/	-	-	++
ind. sCNTf	14 \pm 4	1,75	/	0,04 et 0,03	-	++	++
bCNT	91 \pm 29	0,24	3	0,51 et 0,001	-	++	-
bCNTf	76 \pm 21	0,35	14	0,01 et 0,01	+	+++	-
bCNTd	81 \pm 21	0,35	5	/	+	+	-
CNT	17 \pm 5	1,18 \pm 0,10	9	0,19 et 4,23	+	+	+++
CNTa	17 \pm 5	0,77 \pm 0,13	4	0,01 et 0,00	+	++	+++
CNT2	17 \pm 5	1,01	/	0,01 et 0,00	+	++	+++
CNT3	18 \pm 4	0,98	/	0,01 et 0,01	+	++	+++
CB	42 \pm 10	0,98*	8	0,01 et 0,05	-	-	++
CBf	31 \pm 8	0,81*	14	0,01 et 0,00	-	-	+
NG	20 \pm 9	0,14	8	0,15 et 0,00	+	+	+
NGf	27 \pm 12	0,23	14	0,002 et 0,00	+	++	-

Références

Allen, B.L. et al., 2008. Biodegradation of Single-Walled Carbon Nanotubes through Enzymatic Catalysis. *Nano Letters*, 8(11), p.3899-3903.

Allen, B.L. et al., 2009. Mechanistic Investigations of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Degradation of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), p.17194-17205.

Andón, F.T. et al., 2013. Biodegradation of Single-Walled Carbon Nanotubes by Eosinophil Peroxidase. *Small*, 9(16), p.2721-2729.

Ang, L.M. et al., 2000. Decoration of activated carbon nanotubes with copper and nickel. *Carbon*, 38(3), p.363-372.

Anon, 2013. Bayer withdraws from carbon nanotube activities. *Additives for Polymers*, 2013(7), p.8.

Anon, 2010. *Code de l'environnement - Article L523-1*,

Anon, 2012. *Code du travail - Article L4121-2 - Modifié par la loi n°2012-954 du 6 août 2012 - art. 7*, Available at: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000006903148&cidTexte=LEGITEXT000006072050> [Consulté le septembre 10, 2012].

Anon, *Décret n° 2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire pris en application de l'article L.523-4 du code de l'environnement*, Available at: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000025377246&dateTexte=&categorieLien=id> [Consulté le février 27, 2012].

Anon, 2000. *LOI no 95-101 du 2 février 1995 relative au renforcement de la protection de l'environnement*, Available at: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000551804&fastPos=1&fastReqId=1674561171&categorieLien=cid&oldAction=rechercheTexte> [Consulté le septembre 3, 2012].

Anses, 2014. *Avis et rapport de l'Anses relatifs à l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux - enjeux et mise à jour des connaissances*, Maisons-Alfort: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Available at: <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/AP2012sa0273Ra.pdf> [Consulté le mai 28, 2014].

Anses, 2013. *Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire*, Anses. Available at: http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_public_format_final_20131125.pdf [Consulté le décembre 5, 2013].

Anses, 2012. *Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone - Etat de l'art*, Available at: <http://www.anses.fr/fr/content/toxicit%C3%A9-et-%C3%A9cotoxicit%C3%A9-des-nanotubes-de-carbone-etat-de-l%E2%80%99art-0> [Consulté le novembre 18, 2013].

Arepalli, S., 2004. Protocol for the characterization of single-wall carbon nanotube material quality. *Carbon*, 42, p.1783-1791.

Bakand, S., Hayes, A. & Dechsakulthorn, F., 2012. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhalation Toxicology*, 24(2), p.125-135.

Baughman, R.H., Zakhidov, A.A. & Heer, W.A. de, 2002. Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications. *Science*, 297(5582), p.787-792.

Belin, T. & Epron, F., 2005. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Materials Science and Engineering: B-solid state materials for advanced technology*, 119(2), p.105-118.

Bello, D. et al., 2009. Exposure to nanoscale particles and fibers during machining of hybrid advanced composites containing carbon nanotubes. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), p.231-249.

Bello, D. et al., 2008. Particle exposure levels during CVD growth and subsequent handling of vertically-aligned carbon nanotube films. *Carbon*, 46(6), p.974-977.

Belyanskaya, L. et al., 2007. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction. *Carbon*, 45(13), p.2643-2648.

Bianco, A., Kostarelos, K. & Prato, M., 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(6), p.674-679.

Boehm, H.P., 2002. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. *Carbon*, 40(2), p.145-149.

Boncel, S. et al., 2011. Tunable chemistry and morphology of multi-wall carbon nanotubes as a route to non-toxic, theranostic systems. *Biomaterials*, 32, p.7677-7686.

Bortolamiol, T. et al., 2014. Double-Walled Carbon Nanotubes: Quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening. *Carbon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622314005971> [Consulté le juillet 1, 2014].

Bottini, M. et al., 2006. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology Letters*, 160(2), p.121-126.

Ali-Boucetta, H., Al-Jamal, K.T., et al., 2011. Cellular Uptake and Cytotoxic Impact of Chemically Functionalized and Polymer-Coated Carbon Nanotubes. *Small*, 7(22), p.3230–3238.

Ali-Boucetta, H., Al-Jamal, K.T. & Kostarelos, K., 2011. Cytotoxic assessment of carbon nanotube interaction with cell cultures. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 726, p.299-312.

Bougrine, A. et al., 2001. Influence of high temperature treatments on single-walled carbon nanotubes structure, morphology and surface properties. *Carbon*, 39(5), p.685-695.

Boumahdi, N., 2009. *Approche pluridisciplinaire de l'étude de l'activité biologique de particules fines*. Thèse de doctorat. St Etienne: Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

Boutou-Kempf, O., 2011. *Éléments de faisabilité pour un dispositif de surveillance épidémiologique des travailleurs exposés aux nanomatériaux intentionnellement produits*, St-Maurice: INVS - Institut de Veille Sanitaire. Available at: http://opac.invs.sante.fr/index.php?lvl=notice_display&id=9341&seule=1 [Consulté le juin 1, 2014].

Brown, D.M. et al., 2007. An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon*, 45(9), p.1743-1756.

BSI, 2007. *Nanotechnologies - Part 2: Guide to safe handling and disposal of manufactured nanomaterials*, British Standards Institution. Available at: <http://www.bsigroup.com/upload/Standards%20&%20Publications/Nanotechnologies/PD6699-2.pdf> [Consulté le septembre 3, 2012].

Bussy, C. et al., 2012. Critical role of surface chemical modifications induced by length shortening on multi-walled carbon nanotubes-induced toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(1), p.46.

Bussy, C. et al., 2013. Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: pH-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), p.24.

Cabana, J., 2010. *Fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone : propriétés, réversibilité et applications dans le domaine de l'électronique*. Université de Montréal. Available at: https://papyrus.bib.umontreal.ca/jspui/bitstream/1866/4402/2/Cabana_Janie_2010_these.pdf [Consulté le février 8, 2013].

Caldefie-Chézet, F. et al., 2002. Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. *Clinica Chimica Acta*, 319(1), p.9-17.

Casey, A. et al., 2007. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon*, 45(7), p.1425-1432.

CEA, 2005. *Le nanomonde, de la science aux applications*, Available at: http://www.cea.fr/recherche_fondamentale/le_nanomonde_de_la_science_aux_applications [Consulté le juillet 20, 2012].

Cheng, X.-B. et al., 2013. Robust growth of herringbone carbon nanofibers on layered double hydroxide derived catalysts and their applications as anodes for Li-ion batteries. *Carbon*, 62, p.393-404.

Chen, H. et al., 2011. Cellular response of RAW 264.7 to spray-coated multi-walled carbon nanotube films with various surfactants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96A, p.413-421.

Chen, J. et al., 2008. Removal of entrapped iron compounds from isothermally treated catalytic chemical vapor deposition derived multi-walled carbon nanotubes. *Carbon*, 46(3), p.391-396.

Chen, J. et al., 2007. The structural evolution of thin multi-walled carbon nanotubes during isothermal annealing. *Carbon*, 45(2), p.274-280.

Chen, J., Chen, Q. & Ma, Q., 2012. Influence of surface functionalization via chemical oxidation on the properties of carbon nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 370(1), p.32-38.

Chen, Z., Thiel, W. & Hirsch, A., 2003. Reactivity of the Convex and Concave Surfaces of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs) towards Addition Reactions: Dependence on the Carbon-Atom Pyramidalization. *ChemPhysChem*, 4(1), p.93-97.

Choi, J.-Y., Ramachandran, G. & Kandlikar, M., 2009. The Impact of Toxicity Testing Costs on Nanomaterial Regulation. *Environmental Science & Technology*, 43(9), p.3030-3034.

Collins, P., 2010. Defects and disorder in carbon nanotubes. In A. V. Narlikar & Y. Y. Fu, éd. *The Oxford handbook of nanoscience and technology*. New York: Oxford University Press.

Commission Européenne, 2011. Recommandations de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux 2011/696/UE. *Journal officiel de l'Union Européenne*. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:FR:PDF> [Consulté le juillet 19, 2012].

Crouzier, D. et al., 2010. Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology*, 272(1–3), p.39–45.

Czarny, B. et al., 2014. Carbon Nanotube Translocation to Distant Organs after Pulmonary Exposure: Insights from in Situ ¹⁴C-Radiolabeling and Tissue Radioimaging. *ACS Nano*, 8(6), p.5715–5724.

Dahm, M.M. et al., 2012. Occupational Exposure Assessment in Carbon Nanotube and Nanofiber Primary and Secondary Manufacturers. *Annals of Occupational Hygiene*, 56(5), p.542–556.

Das, S. et al., 2013. Oxygenated Functional Group Density on Graphene Oxide: Its Effect on Cell Toxicity. *Particle & Particle Systems Characterization*, 30(2), p.148–157.

Datsyuk, V. et al., 2008. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 46(6), p.833–840.

Delattre, J., Beaudoux, J.-L. & Bonnefont-Rousselot, D., 2005. *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*, Paris: Éditions Tec & doc : Éditions médicales internationales.

Deng, X. et al., 2007. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon*, 45(7), p.1419–1424.

Donaldson, K. et al., 2010. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), p.5.

Donaldson, K. et al., 2006. Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. *Toxicological Sciences*, 92(1), p.5–22.

Donaldson, K. & Poland, C.A., 2013. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(4), p.724–734.

Dong, P.-X., Wan, B. & Guo, L.-H., 2012. In vitro toxicity of acid-functionalized single-walled carbon nanotubes: Effects on murine macrophages and gene expression profiling. *Nanotoxicology*, 6(3), p.288–303.

Duch, M.C. et al., 2011. Minimizing Oxidation and Stable Nanoscale Dispersion Improves the Biocompatibility of Graphene in the Lung. *Nano letters*, 11(12), p.5201-5207.

Ekoue, A., 2002. *Caractérisations électriques et physico-chimiques des oxydes sur Carbure de Silicium : Application à une technologie MOSFETs*. Lyon: Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. Available at: <http://theses.insa-lyon.fr/publication/2002ISAL0108/these.pdf> [Consulté le juin 3, 2014].

Elgrabli, D. et al., 2008. Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. *Particle and Fibre Toxicology*, 5(1), p.20.

Ellinger-Ziegelbauer, H. & Pauluhn, J., 2009. Pulmonary toxicity of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes®) relative to α -quartz following a single 6 h inhalation exposure of rats and a 3 months post-exposure period. *Toxicology*, 266(1-3), p.16-29.

Erdely, A. et al., 2013. Carbon nanotube dosimetry: from workplace exposure assessment to inhalation toxicology. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), p.53.

Favier, A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L' Actualité chimique*, (11-12), p.108-115.

Fenoglio, I. et al., 2006. Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity? *Free Radical Biology and Medicine*, 40(7), p.1227-1233.

Fenoglio, I. et al., 2008. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: Physicochemical aspects. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), p.1690-1697.

Fenoglio, I. et al., 2012. Thickness of Multiwalled Carbon Nanotubes Affects Their Lung Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 25(1), p.74-82.

Fertsch-Gapp, S. et al., 2011. Binding of polystyrene and carbon black nanoparticles to blood serum proteins. *Inhalation Toxicology*, 23(8), p.468-475.

Fery, L., 2013. Nanotubes de carbone : le marché sera plus restreint, selon Arkema. Available at: <http://www.industrie-techno.com/nanotubes-de-carbone-le-marche-sera-plus-restreint-selon-arkema.23794> [Consulté le mai 12, 2014].

Feynman, R.P., 1959. There's Plenty of Room at the Bottom. An Invitation to Enter a New Field of Physics. Available at: <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html> [Consulté le juillet 19, 2012].

Figarol, A. et al., 2014. Biological response to purification and acid functionalization of carbon nanotubes. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(7), p.1-12.

FIOH, 2013. *Evaluation of the health effects of carbon nanotubes*, Helsinki: Finnish Institute of Occupational Health. Available at: http://www.ttl.fi/en/publications/electronic_publications/pages/evaluation_of_the_health_effects_of_carbon_nanotubes.aspx [Consulté le novembre 29, 2013].

Fraczek-Szczypta, A. et al., 2012. Effect of MWCNT surface and chemical modification on in vitro cellular response. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(10), p.1-14.

Fröhlich, E. et al., 2012. Combination of small size and carboxyl functionalisation causes cytotoxicity of short carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, p.1-14.

Gaffet, E., 2012. Pour un développement maîtrisé des nanomatériaux : l'approche « safe by design ». In Séminaire annuel OMNT 2012. Institut Pasteur, Paris. Available at: <http://www.omnt.fr/sem2012/> [Consulté le mars 20, 2012].

Galano, A., Francisco-Marquez, M. & Martinez, A., 2010. Influence of Point Defects on the Free-Radical Scavenging Capability of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(18), p.8302-8308.

Ge, C. et al., 2012. The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. *NPG Asia Materials*, 4(12), p.e32.

Di Giorgio, M.L. et al., 2011. Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 722(1), p.20-31.

Grady, B.P., 2002. Polymer Characterization - Research Group - Structural Composites. *Polymer and Nanomaterials Characterization, cmbe : chemical, biological & material engineering*. Available at: <http://coecs.ou.edu/Brian.P.Grady/nanotube.html> [Consulté le septembre 21, 2012].

Grenelle I, 2010. *LOI n° 2009-967 du 3 août 2009 de programmation relative à la mise en œuvre du Grenelle de l'environnement* | *Legifrance*, Available at: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020949548> [Consulté le juillet 5, 2012].

Grenelle II, 2012. *LOI n° 2010-788 du 12 juillet 2010 portant engagement national pour l'environnement* | *Legifrance*, Available at: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022470434> [Consulté le juillet 5, 2012].

Gustavsson, P., Hedmer, M. & Rissler, J., 2012. *Carbon nanotubes – Exposure, toxicology and protective measures in the work environment*, Swedish Work Environment Authority (Arbetsmiljöverket). Available at: http://www.av.se/dokument/aktuellt/kunskapsoversikt/kolnanoror_eng.pdf [Consulté le juin 21, 2012].

Gutiérrez-Praena, D. et al., 2011. Influence of carboxylic acid functionalization on the cytotoxic effects induced by single wall carbon nanotubes on human endothelial cells (HUVEC). *Toxicology in Vitro*, 25(8), p.1883-1888.

Hamilton, R.F., Wu, Z., et al., 2013. Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on in vitro and in vivo toxicity, inflammation and lung pathology. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), p.57.

Hamilton, R.F., Xiang, C., et al., 2013. Purification and sidewall functionalization of multiwalled carbon nanotubes and resulting bioactivity in two macrophage models. *Inhalation toxicology*, 25(4), p.199-210.

Han, J.H. et al., 2008. Monitoring Multiwalled Carbon Nanotube Exposure in Carbon Nanotube Research Facility. *Inhalation Toxicology*, 20, p.741-749.

Hawgood, S. & Clements, J.A., 1990. Pulmonary surfactant and its apoproteins. *Journal of Clinical Investigation*, 86(1), p.1-6.

Hervé-Bazin, B., 2006. *Toxicité pulmonaire des particules ultrafines*, Techniques de l'Ingénieur. Available at: <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/securite-et-gestion-des-risques-ti112/toxicite-pulmonaire-des-particules-ultrafines-nm8100/> [Consulté le novembre 25, 2011].

Hirsch, C. et al., 2011. A novel comprehensive evaluation platform to assess nanoparticle toxicity in vitro. *Journal of Physics: Conference Series*, 304, p.012053.

Hirth, S. et al., 2013. Scenarios and methods that induce protruding or released CNTs after degradation of nanocomposite materials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4), p.1-15.

Holder, A.L. et al., 2012. Particle-Induced Artifacts in the MTT and LDH Viability Assays. *Chemical Research in Toxicology*, 25(9), p.1885-1892.

Huang, X., Kobos, R.K. & Gann, X., 2007. Hair coloring and cosmetic compositions comprising carbon nanotubes.

Hummers, W.S. & Offeman, R.E., 1958. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6), p.1339-1339.

IARC, 2010. Carbon Black. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc*. WHO Press, p. 149. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/mono93-6.pdf> [Consulté le avril 17, 2014].

IFA, 2011. *Technical information: Ultrafine aerosols and nanoparticles at the workplace, Criteria for assessment of the effectiveness of protective measures*, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. Available at: <http://www.dguv.de/ifa/en/fac/nanopartikel/beurteilungsmassstaebe/index.jsp> [Consulté le septembre 3, 2012].

Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, p.56-58.

iRAP, I.R. and P.I., 2011. *Production and applications of carbon nanotubes, carbon nanofibers, fullerenes, graphenes ad nanodiamonds: a global technology survey and market analysis*, Available at: http://www.innoresearch.net/report_summary.aspx?id=77&pg=531&rkd=et-113&pd=2/1/2011 [Consulté le juillet 27, 2012].

ISO - International Organization for Standardization, 2012a. *ISO/TR 13014:2012 - Nanotechnologies -- Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment*, Available at: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=52334 [Consulté le mars 5, 2013].

ISO - International Organization for Standardization, 2012b. *ISO/TS 12901-1:2012 - Nanotechnologies -- Occupational risk management applied to engineered nanomaterials -- Part 1: Principles and approaches*, Available at: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=52125 [Consulté le mai 12, 2014].

ISO - International Organization for Standardization, 2011. *ISO/TS 80004-4:2011 Nanotechnologies - Vocabulaire - Partie 4: matériaux nanostructurés*, Available at: <http://sagaweb.afnor.org/fr-FR/sw/Consultation/Notice/1381627> [Consulté le septembre 26, 2013].

ISO/TS 27687:2008, 2008. *Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*. Available at: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=44278 [Consulté le juillet 19, 2012].

Jain, S. et al., 2011. Toxicity of Multiwalled Carbon Nanotubes with End Defects Critically Depends on Their Functionalization Density. *Chemical Research in Toxicology*, 24(11), p.2028-2039.

Jastrzębska, A.M., Kurtycz, P. & Olszyna, A.R., 2012. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(12). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3517804/> [Consulté le décembre 20, 2012].

Jensen, M. & Erichsen, H., 2008. Pale d'éolienne avec récepteurs de foudre comprenant des nanotubes de carbone. , (WO 2009/080048).

Jeon, I.-Y. et al., 2011. Functionalization of Carbon Nanotubes. In *Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites*. Dr. Siva Yellampalli, p. 396. Available at: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/16991.pdf> [Consulté le juillet 4, 2013].

Jiang, Y. et al., 2013. Modulation of Apoptotic Pathways of Macrophages by Surface-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes. *PLoS ONE*, 8(6), p.e65756.

Johnson, D.R. et al., 2010. Potential for Occupational Exposure to Engineered Carbon-Based Nanomaterials in Environmental Laboratory Studies. *Environmental Health Perspectives*, 118(1), p.49-54.

Kagan, V.E. et al., 2006. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicology Letters*, 165(1), p.88-100.

Kapralov, A.A. et al., 2012. Adsorption of Surfactant Lipids by Single-Walled Carbon Nanotubes in Mouse Lung upon Pharyngeal Aspiration. *ACS Nano*, 6(5), p.4147-4156.

Karlik, M. & Jouffrey, B., 2008. *Étude des métaux par microscopie électronique en transmission (MET) - Microscope, échantillons et diffraction*, Techniques de l'Ingénieur. Available at: <http://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42343210-m4134.pdf> [Consulté le juin 2, 2014].

Kato, T. et al., 2012. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology*, p.1-10.

Kayat, J. et al., 2011. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(1), p.40-49.

Kelty, C., 2009. Beyond Implications and Applications: the Story of « Safety by Design ». *Nanoethics*, 3(2), p.79-96.

- Kimberly J Ong, T.J.M., 2014. Widespread nanoparticle-assay interference: implications for nanotoxicity testing. *PLoS one*, 9(3), p.e90650.
- Kim, J.S. et al., 2010. Aspect ratio has no effect on genotoxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Archives of Toxicology*, 85(7), p.775-786.
- Klink, S. et al., 2012. Tailoring of CNT surface oxygen groups by gas-phase oxidation and its implications for lithium ion batteries. *Electrochemistry Communications*, 15(1), p.10-13.
- Kosynkin, D.V. et al., 2009. Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons. *Nature*, 458(7240), p.872-U5.
- Kotchey, G.P. et al., 2013. Peroxidase-mediated Biodegradation of Carbon Nanotubes in vitro and in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X13001610> [Consulté le juillet 16, 2013].
- Kroll, A. et al., 2011. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1), p.1-19.
- Krug, H.F. & Wick, P., 2011. Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. *Angewandte Chemie-International Edition*, 50(6), p.1260-1278.
- Kuhlbusch, T.A. et al., 2011. Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: A review. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1), p.22.
- Kuschner, M. & Wright, G., 1976. The effect of intratracheal instillation of glass fiber of varying sizes in guinea pigs. *Occupational Exposure to Fibrous Glass, Proceedings of a Symposium*, p.151-169.
- Lacour, S., Desmoulin-Canselier, S. & Hervé-Fournereau, N., 2012. *De l'innovation à l'utilisation des nanomatériaux, Le cadre normatif des nanotubes de carbone* 1re Edition., Larcier. Available at: http://editions.larcier.com/titres/125605_2/de-l-innovation-a-l-utilisation-des-nanomateriaux.html [Consulté le juillet 12, 2012].
- Lam, C.-W. et al., 2004. Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. *Toxicological Sciences*, 77(1), p.126-134.
- Lammel, T. et al., 2013. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), p.27.

Landois, P., 2008. *Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement des nanotubes de carbone*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse III Paul Sabatier. Available at: http://thesesups.ups-tlse.fr/360/1/Landois_Perine.pdf [Consulté le octobre 21, 2011].

Lanone, S. et al., 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), p.14.

Laurent, C., Flahaut, E. & Peigney, A., 2010. The weight and density of carbon nanotubes versus the number of walls and diameter. *Carbon*, 48(10), p.2994-2996.

Lee, C.J., Park, J.H. & Park, J., 2000. Synthesis of bamboo-shaped multiwalled carbon nanotubes using thermal chemical vapor deposition. *Chemical Physics Letters*, 323(5-6), p.560-565.

Lee, J.H. et al., 2010. Exposure assessment of carbon nanotube manufacturing workplaces. *Inhalation Toxicology*, 22(5), p.369-381.

Lehman, J.H. et al., 2011. Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. *Carbon*, 49(8), p.2581-2602.

Le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne, 2006. *Règlement (CE) N° 1907/2006 du parlement européen et du conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission*, Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0849:FR:PDF> [Consulté le septembre 3, 2012].

Liao, K.-H. et al., 2011. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(7), p.2607-2615.

Linsinger, T. et al., 2012. *Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term « nanomaterial »*, Publications Office of the European Union. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/26399/1/irmm_nanomaterials%20\(online\).pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/26399/1/irmm_nanomaterials%20(online).pdf) [Consulté le octobre 11, 2012].

Li, R. et al., 2013. Surface Charge and Cellular Processing of Covalently Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes Determine Pulmonary Toxicity. *ACS Nano*, 7(3), p.2352-2368.

- Liu, Z. et al., 2008. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), p.1410-1415.
- Li, Y. et al., 2012. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, 33(2), p.402-411.
- Lombard, A., 2009. Toxicologie industrielle. *Techniques de l'ingénieur*. Available at: <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/risques-chimiques-pesticides-et-produits-phytosanitaires-42568210/toxicologie-industrielle-se1605/voies-de-penetration-dans-l-organisme-se1605niv10002.html#2.1> [Consulté le mars 7, 2013].
- Lorena Montes-Fonseca, S. et al., 2012. Cytotoxicity of functionalized carbon nanotubes in J774A macrophages. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 8(6), p.853-859.
- Lu, K.L. et al., 1996. Mechanical damage of carbon nanotubes by ultrasound. *Carbon*, 34(6), p.814-816.
- Lynch, I. & Dawson, K.A., 2008. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, 3(1-2), p.40-47.
- Ma-Hock, L. et al., 2013. Comparative inhalation toxicity of multi-wall carbon nanotubes, graphene, graphite nanoplatelets and low surface carbon black. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), p.23.
- Ma-Hock, L. et al., 2009. Inhalation Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes in Rats Exposed for 3 Months. *Toxicological Sciences*, 112, p.468-481.
- Mangum, J.B. et al., 2006. Single-Walled Carbon Nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages In Situ. *Particle and Fibre Toxicology*, 3(1), p.15.
- Mao, H. et al., 2013. Hard corona composition and cellular toxicities of the graphene sheets. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 109, p.212-218.
- Maynard, A.D. et al., 2004. Exposure to Carbon Nanotube Material: Aerosol Release During the Handling of Unrefined Single-Walled Carbon Nanotube Material. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 67, p.87-107.

REFERENCES

- Meng, L. et al., 2013. Inhibitory effects of multiwall carbon nanotubes with high iron impurity on viability and neuronal differentiation in cultured PC12 cells. *Toxicology*, 313(1), p.49-58.
- Mercer, R.R. et al., 2008. Alteration of deposition pattern and pulmonary response as a result of improved dispersion of aspirated single-walled carbon nanotubes in a mouse model. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(1), p.L87 -L97.
- Mercer, R.R. et al., 2011. Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1), p.21.
- Migliore, L. et al., 2010. Carbon Nanotubes Induce Oxidative DNA Damage in RAW 264.7 Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(4), p.294-303.
- Mitchell, L.A. et al., 2007. Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes. *Toxicological Sciences*, 100(1), p.203-214.
- Möhlmann, C., 2014. German Activity on the Ultra-fine Particles in the Workplaces.
- Monteiro-Riviere, N.A., Inman, A.O. & Zhang, L.W., 2009. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), p.222-235.
- Muller, J. et al., 2009. Absence of Carcinogenic Response to Multiwall Carbon Nanotubes in a 2-Year Bioassay in the Peritoneal Cavity of the Rat. *Toxicological Sciences*, 110(2), p.442-448.
- Muller, J. et al., 2005. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(3), p.221-231.
- Muller, J. et al., 2008. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: toxicological aspects. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), p.1698-1705.
- Mullick Chowdhury, S. et al., 2013. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials*, 34(1), p.283-293.
- Mundra, R.V. et al., 2014. Nanotubes in biological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 28, p.25-32.

Murphy, F.A. et al., 2011. Length-Dependent Retention of Carbon Nanotubes in the Pleural Space of Mice Initiates Sustained Inflammation and Progressive Fibrosis on the Parietal Pleura. *The American Journal of Pathology*, 178(6), p.2587-2600.

Murray, A.R. et al., 2012. Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(1), p.10.

Murr, L.E. & Soto, K.F., 2004. TEM comparison of chrysotile (asbestos) nanotubes and carbon nanotubes. *Journal of Materials Science*, 39(15), p.4941-4947.

Nagai, H. et al., 2011. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), p.E1330-E1338.

Nel, A.E. et al., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*, 8(7), p.543-557.

NIOSH, 2013. *Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers*, Department of health and human services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. Available at: http://www.cdc.gov/niosh/docket/review/docket161a/pdfs/carbonNanotubeCIB_PublicReviewOfDraft.pdf [Consulté le septembre 3, 2012].

Novoselov, K.S. et al., 2004. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696), p.666-669.

Nowack, B. et al., 2013. Potential release scenarios for carbon nanotubes used in composites. *Environment International*, 59, p.1-11.

Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*, 113, p.823-839.

OECD, 2012. *Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials*, Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available at: <http://search.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO%282012%2940&docLanguage=En> [Consulté le février 8, 2013].

Olakanmi, O. et al., 1993. Iron sequestration by macrophages decreases the potential for extracellular hydroxyl radical formation. *Journal of Clinical Investigation*, 91(3), p.889-899.

REFERENCES

OpenStax College, 2013. *Anatomy & Physiology*, Available at: <http://cnx.org/content/col11496/latest/> [Consulté le juin 25, 2014].

Osmond-McLeod, M.J. et al., 2011. Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1), p.15.

Pailleux, M. et al., 2013. New insight into artifactual phenomena during in vitro toxicity assessment of engineered nanoparticles: Study of TNF- α adsorption on alumina oxide nanoparticle. *Toxicology in Vitro*, 27(3), p.1049-1056.

Pauluhn, J., 2010. Subchronic 13-Week Inhalation Exposure of Rats to Multiwalled Carbon Nanotubes: Toxic Effects Are Determined by Density of Agglomerate Structures, Not Fibrillar Structures. *Toxicological Sciences*, 113(1), p.226-242.

Peigney, A. et al., 2001. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon*, 39(4), p.507-514.

PEN The Project on Emerging Nanotechnologies, 2014. Consumer Product Inventory - Carbon Nanotubes. Available at: <http://www.nanotechproject.org/cpi/search-products/page2?nanomaterials%5B%5D=1129> [Consulté le octobre 16, 2013].

Pescatori, M. et al., 2013. Functionalized carbon nanotubes as immunomodulator systems. *Biomaterials*, 34(18), p.4395-4403.

Petersen, E.J. & Henry, T.B., 2012. Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes: Review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), p.60-72.

Poland, C.A. et al., 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology*, 3(7), p.423-428.

Poland, C.A. et al., 2014. The elephant in the room: reproducibility in toxicology. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), p.42.

Porter, D.W. et al., 2010. Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology*, 269(2-3), p.136-147.

Pulskamp, K., Diabaté, S. & Krug, H.F., 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters*, 168(1), p.58-74.

Radushkevich, L.V. & Lukyanovich, V.M., 1952. O strukture ugleroda, obrazujucesja pri termiceskom razlozenii okisi ugleroda na zeleznom kontakte. *Soviet Journal of Physical Chemistry*, 26, p.88-95.

Raman, C.V. & Krishnan, K.S., 1928. A new type of secondary radiation. *Nature*, 121, p.501-502.

Reibold, M. et al., 2006. Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature*, 444(7117), p.286-286.

Reilly, R.M., 2007. Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(7), p.1039-1042.

Ricaud, M., 2012. *Nanomatériaux. Prévention des risques dans les laboratoires*, INRS, CRAM, CARSAT, CNRS. Available at: <http://www.inrs.fr/accueil/produits/mediatheque/doc/publications.html?refINRS=ED%206115> [Consulté le février 27, 2012].

Ricaud, M., Lafon, D. & ROOS, F., 2008. *Les nanotubes de carbone: quels risques, quelle prévention?*, INRS. Available at: [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/intranetobject-accesparreference/ND%202286/\\$file/nd2286.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/intranetobject-accesparreference/ND%202286/$file/nd2286.pdf) [Consulté le mars 6, 2012].

Roche Diagnostics, 2008. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation. Available at: http://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf [Consulté le décembre 17, 2013].

Rosca, I.D. et al., 2005. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon*, 43(15), p.3124-3131.

Ruipérez, F. et al., 2012. Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, p.118-123.

Russier, J. et al., 2011. Oxidative biodegradation of single- and multi-walled carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3(3), p.893-896.

Ruste, J., 2013. *Microscopie électronique à balayage - Principe et équipement*, Techniques de l'Ingénieur. Available at: <http://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42387210-p865.pdf> [Consulté le juin 2, 2014].

Safe Work Australia, 2012. *Classification of Carbon Nanotubes as Hazardous Chemicals*, Available at:

http://www.safeworkaustralia.gov.au/sites/SWA/AboutSafeWorkAustralia/WhatWeDo/Publications/Documents/726/Classification_of_Carbon_Nanotubes_as_Hazardous_Chemicals.pdf [Consulté le novembre 6, 2012].

Sasidharan, A. et al., 2011. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale*, 3(6), p.2461-2464.

Sasidharan, A. et al., 2012. Hemocompatibility and Macrophage Response of Pristine and Functionalized Graphene. *Small*, 8(8), p.1251-1263.

Schinwald, A. et al., 2011. Graphene-Based Nanoplatelets: A New Risk to the Respiratory System as a Consequence of Their Unusual Aerodynamic Properties. *ACS Nano*, 6(1), p.736-746.

Schinwald, A. et al., 2012. The Threshold Length for Fiber-Induced Acute Pleural Inflammation: Shedding Light on the Early Events in Asbestos-Induced Mesothelioma. *Toxicological Sciences*, 128(2), p.461-470.

Schniepp, H.C. et al., 2006. Functionalized Single Graphene Sheets Derived from Splitting Graphite Oxide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(17), p.8535-8539.

Schrurs, F. & Lison, D., 2012. Focusing the research effort. *Nature Nanotechnology*, 7(9), p.546-548.

Schweinberger, F.F. & Meyer-Plath, A., 2011. Status of characterization techniques for carbon nanotubes and suggestions towards standards suitable for toxicological assessment. *Journal of Physics: Conference Series*, 304, p.012087.

Shukla, P.K. & Mishra, P.C., 2010. Effects of diameter, length, chirality and defects on the scavenging action of single-walled carbon nanotubes for OH radicals: A quantum computational study. *Chemical Physics*, 369(2-3), p.101-107.

Shvedova, A.A. et al., 2008. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(4), p.L552-L565.

Shvedova, A.A. et al., 2009. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacology & Therapeutics*, 121(2), p.192-204.

Shvedova, A.A., 2005. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289, p.L698-L708.

Simon-Deckers, A., 2008. *Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques*. Thèse de doctorat. CEA Saclay, UMR9956 , Laboratoire Pierre Süe F-91191 Gif-sur-Yvette: Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).

Singh, S. et al., 2012. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, p.5361.

Sohaebuddin, S.K. et al., 2010. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), p.22.

Soldano, C., Mahmood, A. & Dujardin, E., 2010. Production, properties and potential of graphene. *Carbon*, 48(8), p.2127-2150.

Song, M. et al., 2013. Study of cytotoxic effects of single-walled carbon nanotubes functionalized with different chemical groups on human MCF7 cells. *Chemosphere*, 92(5), p.576-582.

Song, S. et al., 2010. Defects of multi-walled carbon nanotubes as active sites for benzene hydroxylation to phenol in the presence of H₂O₂. *Catalysis Communications*, 11(8), p.783-787.

Tabet, L. et al., 2011. Coating carbon nanotubes with a polystyrene-based polymer protects against pulmonary toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 8, p.3.

Takagi, A. et al., 2012. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Science*, 103(8), p.1440-1444.

Tran, C. et al., 2011. A hypothetical model for predicting the toxicity of high aspect ratio nanoparticles (HARN). *Journal of Nanoparticle Research*, 13(12), p.6683-6698.

Turci, F. et al., 2011. The Iron-Related Molecular Toxicity Mechanism of Synthetic Asbestos Nanofibres: A Model Study for High-Aspect-Ratio Nanoparticles. *Chemistry – A European Journal*, 17(1), p.350-358.

Ursini, C.L. et al., 2012. Comparative cyto-genotoxicity assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 26(6), p.831-840.

US EPA National Center for Environmental Assessment, R.T.P.N. & Powers, C., Nanomaterial Case Study: A Comparison of Multiwalled Carbon Nanotube and

Decabromodiphenyl Ether Flame-Retardant Coatings Applied to Upholstery Textiles (External Review Draft). Available at: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.cfm?deid=244011#Download> [Consulté le juillet 27, 2012].

Vietti, G. et al., 2013. Towards predicting the lung fibrogenic activity of nanomaterials: experimental validation of an in vitro fibroblast proliferation assay. *Particle and Fibre Toxicology*, 10, p.52-52.

Vlasova, I.I. et al., 2011. Peroxidase-induced degradation of single-walled carbon nanotubes: hypochlorite is a major oxidant capable of in vivo degradation of carbon nanotubes. In *Journal of Physics: Conference Series*. Nanotechnology International Forum. p. 5. Available at: http://iopscience.iop.org/1742-6596/291/1/012056/pdf/1742-6596_291_1_012056.pdf. [Consulté le mars 14, 2014].

Voiry, D., 2010. *Solubilisation et fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone et autres formes de carbone nanostructurées*. Bordeaux 1. Available at: <http://www.theses.fr/2010BOR14085> [Consulté le mai 27, 2014].

De Volder, M.F.L. et al., 2013. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. *Science*, 339(6119), p.535-539.

Wan, B. et al., 2013. Single-walled carbon nanotubes and graphene oxides induce autophagosome accumulation and lysosome impairment in primarily cultured murine peritoneal macrophages. *Toxicology Letters*, 221(2), p.118-127.

Wang, X. et al., 2010. Quantitative Techniques for Assessing and Controlling the Dispersion and Biological Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes in Mammalian Tissue Culture Cells. *Acs Nano*, 4(12), p.7241-7252.

Warheit, D.B. et al., 2004. Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicological Sciences*, 77(1), p.117-125.

Wepasnick, K.A. et al., 2011. Surface and structural characterization of multi-walled carbon nanotubes following different oxidative treatments. *Carbon*, 49(1), p.24-36.

Witschberg, O. et al., 2012. *Préconisations en matière de caractérisation des potentiels d'émission et d'exposition professionnelle aux aérosols lors d'opérations mettant en oeuvre des nanomatériaux*, INRS, INERIS, CEA. Available at: [http://www.hst.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/IntranetObject-accesParReference/HST_ND%202355/\\$File/ND2355.pdf](http://www.hst.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/IntranetObject-accesParReference/HST_ND%202355/$File/ND2355.pdf) [Consulté le septembre 10, 2012].

- Witschberg, O. & Fabriès, J.-F., 2005. *Particules ultra-fines et santé au travail - 1. Caractéristiques et effets potentiels sur la santé*, INRS. Available at: <http://www.inrs.fr/accueil/produits/mediatheque/doc/publications.html?refINRS=ND%202227> [Consulté le mars 20, 2012].
- Wojtoniszak, M. et al., 2012. Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89, p.79-85.
- Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K. & Krug, H.F., 2006. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Letters*, 6, p.1261-1268.
- Yamamoto, G. et al., 2014. Structure-property relationships in thermally-annealed multi-walled carbon nanotubes. *Carbon*, 66, p.219-226.
- Yamashita, K. et al., 2010. Carbon Nanotubes Elicit DNA Damage and Inflammatory Response Relative to Their Size and Shape. *Inflammation*, 33(4), p.276-280.
- Yang, S.-T. et al., 2013. Biodistribution of multi-walled carbon nanotubes functionalized by hydroxyl terminated poly(ethylene glycol) in mice. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 295(2), p.1181-1186.
- Yuan, J., Gao, H. & Ching, C.B., 2011. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: An iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicology Letters*, 207(3), p.213-221.
- Zhang, T. et al., 2012. Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages. *Journal of Hazardous Materials*, 219-220(0), p.203-212.
- Zhang, X. et al., 2012. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond. *Toxicology Research*, 1(1), p.62-68.
- Zhang, X., Yin, J., et al., 2011. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon*, 49(3), p.986-995.
- Zhang, X., Zhu, Y., et al., 2011. Tuning the cellular uptake and cytotoxicity of carbon nanotubes by surface hydroxylation. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(12), p.6941-6952.
- Zhang, Y. et al., 2010. Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells. *ACS Nano*, 4(6), p.3181-3186.

REFERENCES

Zhao, Y., Allen, B.L. & Star, A., 2011. Enzymatic Degradation of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Journal of Physical Chemistry A*, 115(34), p.9536-9544.

Zhou, H. et al., 2012. The interactions between pristine graphene and macrophages and the production of cytokines/chemokines via TLR- and NF-kappa B-related signaling pathways. *Biomaterials*, 33(29), p.6933-6942.

Annexes

Sommaire des annexes

Sommaire des annexes	227
Liste des figures des annexes	228
A1. Méthodes	229
A1.1. Manipulation de poudres sèches	229
A1.2. Techniques d'analyse physico-chimique	229
A1.2.1. Rappel sur les interactions électron/matière	230
A1.2.2. Morphologie	231
Microscopie électronique à balayage	231
Microscopie électronique à transmission	232
A1.2.3. Surface spécifique	233
Technique de Brunauer Emmett Teller	233
A1.2.4. Composition chimique	233
Spectrométrie Raman	233
Spectrométrie de photoélectrons induits par les rayons X	234
Spectrométrie de masse de thermodésorption	236
Spectrométrie par torche plasma	237
A1.2.5. Diffusion dynamique de la lumière	238
Dispersion et stabilité	238
Potentiel zêta	239
A1. 3. Caractérisation biologique	240
A1.3.1. Doses <i>in vitro</i>	240
A1.3.2. Morphologie cellulaire, coloration MGG	241
A1.3.3. Cytotoxicité, LDH	242
A1.3.4. Réponse pro-inflammatoire, TNF- α	243
A1.3.5. Stress oxydant, ROS	244
A1.3.6. Statistiques	244
A1.3.7. Cytométrie en flux	245
A2. Différences entre les deux lots de CNT fonctionnalisés à l'acide	246

Liste des figures des annexes

Figure A 1 : Interactions rayonnement/matière (Karlik & Jouffrey 2008)	230
Figure A 2 : Principe de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage (Ruste 2013)	231
Figure A 3 : Principe de fonctionnement d'un microscope électronique à transmission (Karlik & Jouffrey 2008)	232
Figure A 4 : Représentation de l'aire occupée par une molécule de gaz en surface de l'échantillon lors d'une mesure B.E.T.	233
Figure A 5 : Illustration des différences des pics D et G des spectres Raman de nanomatériaux de carbone (Lehman et al. 2011)	234
Figure A 6 : Principe de la photoémission (Ekoue 2002)	235
Figure A 7 : Schéma du montage d'un appareil de thermodésorption.	236
Figure A 8 : Principe de l'ICP-AES	237
Figure A 9 : Principe de diffusion dynamique de la lumière (image de Mike Jones)	238
Figure A 10 : Charges et potentiels électriques d'une particule (Simon-Deckers 2008)	239
Figure A 11 : Macrophages RAW 264.7 colorés au MGG, observation au microscope optique. Les noyaux apparaissent violet foncé, tandis que les cytoplasmes apparaissent bleu clair témoignant d'une légère basophilie.	242
Figure A 12 : Principe du test LDH	242
Figure A 13 : Principe du dosage ELISA du TNF- α	244
Figure A 14 : Principe du test de détection des ROS au DCFH-DA	244
Figure A 15 : Schéma d'un cytomètre de flux.	245
Figure A 16 : Exemple de cytogramme avec un fenêtrage permettant de sélectionner uniquement les cellules vivantes (en verte)	245
Figure A 17 : Etude du stress oxydant par dosage des ROS après 90 min de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT) et fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$)	247
Figure A 18 : Etude de la cytotoxicité par mesure de la LDH relarguée après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT) et fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), NS : résultats non significativement différents entre les types de CNT.	248
Figure A 19 : Etude de la réponse pro-inflammatoire par dosage du TNF- α après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT) et fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$)	248

A1. Méthodes

A1.1. Manipulation de poudres sèches

Les poudres sèches de nanomatériaux sont manipulées selon les recommandations existantes (voir Chapitre 1, I.3.3.2.) dans un laboratoire confiné avec accès réglementé. Celui-ci est en légère sous-pression pour éviter toute sortie de particules aérosolisées. Des boîtes à gants sont utilisées pour les manipulations sur de grandes quantités de poudres de nanomatériaux. Les pesées s'effectuent sous hotte avec stabilisateur de flux et filtre adapté. Les déchets sont récupérés, confinés, étiquetés et traités spécifiquement par une entreprise spécialisée externe.

Ce laboratoire est de plus équipé d'un sas permettant à l'opérateur de revêtir ses équipements de protection individuel. Ceux-ci sont composés :

1. d'une combinaison Tyvek[®],
2. d'une paire de manchette,
3. de deux paires de gants jetables (alternance latex et nitrile),
4. de lunettes de protection,
5. d'un demi-masque jetable de type FFP3.

Les manipulations en voie sèche sont réduites au maximum. Pour les techniques de caractérisation se réalisant sur poudres, les échantillons sont préparés à l'intérieur de ce laboratoire afin de minimiser l'utilisation des poudres à l'extérieur. Pour toutes les autres expériences, les nanomatériaux sont utilisés en suspension liquide.

A1.2. Techniques d'analyse physico-chimique

L'ISO (ISO, 2012a) a recommandé de caractériser un nanomatériau selon 9 paramètres physico-chimiques préférentiels (voir Chapitre 1, III.2.4.). La commission européenne a publié un rapport présentant les techniques à disposition et certaines difficultés inhérentes à leur utilisation pour des nanomatériaux (Linsinger et al. 2012). Le choix des techniques utilisées pour cette thèse se base sur ce rapport et sur des publications ciblées sur les CNT (Arepalli 2004; Belin & Epron 2005; Lehman et al. 2011).

A1.2.1. Rappel sur les interactions électron/matière

Les techniques de microscopie électronique et de spectroscopie reposent sur les propriétés optiques des matériaux. La **Figure A 1** rappelle schématiquement les principales interactions entre un faisceau incident d'électrons, ou un faisceau électromagnétique (lumière visible, UV, IR ou rayons X) et un échantillon mince. Les interactions électron/matière sont de deux types :

1. élastiques : pas de perte d'énergie, si le rayonnement incident est électromagnétique on parle de diffusion Rayleigh, s'il s'agit d'un faisceau incident d'électrons on parle de rétrodiffusion
2. inélastiques : transfert d'énergie des électrons incidents aux électrons de l'échantillon conduisant à l'émission d'un rayonnement, il s'agit de la diffusion Compton.

Les électrons secondaires proviennent de l'ionisation d'un électron faiblement lié d'un des atomes de l'échantillon. Si l'énergie apportée par le rayon incident est assez élevée pour arracher un électron d'une couche interne, un électron d'une couche plus externe va combler la lacune quantique par un phénomène de relaxation (ou désexcitation). Cette relaxation peut conduire à l'émission d'une catholuminescence (énergie de transition modérée) ou d'un photon X. L'énergie du photon X peut être directement réabsorbée par l'atome et provoquer l'éjection d'un électron de couche externe : émission d'électrons Auger.

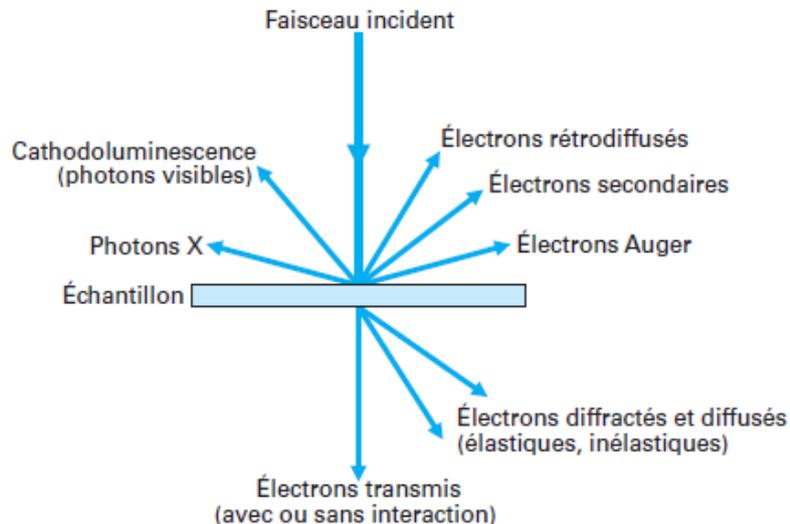


Figure A 1 : Interactions rayonnement/matière (Karlik & Jouffrey 2008)

A1.2.2. Morphologie

Microscopie électronique à balayage

Les appareils de microscopie à balayage (MEB) les plus récents disposent d'un canon à électrons, ou canon à émission de champ (« field emission gun » FEG). Leur meilleure résolution permet de réaliser des images plus fines des nanomatériaux. La **Figure A 2** présente schématiquement le fonctionnement d'un FEG-MEB en mode imagerie classique. Le canon à électrons comprend une source d'électrons, un dispositif de haute tension et un accélérateur d'électrons. Les électrons sont guidés à travers une colonne sous vide. Une combinaison de lentilles, de condenseurs et un diaphragme permettent de focaliser le rayon d'électrons sur l'échantillon à analyser. Une partie de ces électrons interagissent de manière inélastique avec les électrons situés sur les orbitales externes des atomes composant l'échantillon analysé. Les électrons secondaires qui résultent de cette interaction forment un faisceau incident dont le signal est amplifié et détecté. L'intensité du signal ne dépend pas de la composition chimique de l'échantillon, mais de l'angle entre sa surface et le faisceau d'électrons primaire. Plus l'angle est rasant, plus le volume d'interaction entre les électrons du faisceau incident et ceux de l'échantillon est important. Une « pente » va donc produire une quantité d'électrons secondaires plus importante qu'un « plat ». L'information est enfin traduite en images donnant la cartographie des reliefs de l'échantillon, avec obtention de données renseignant essentiellement sur la morphologie et les caractéristiques de surface de l'échantillon.

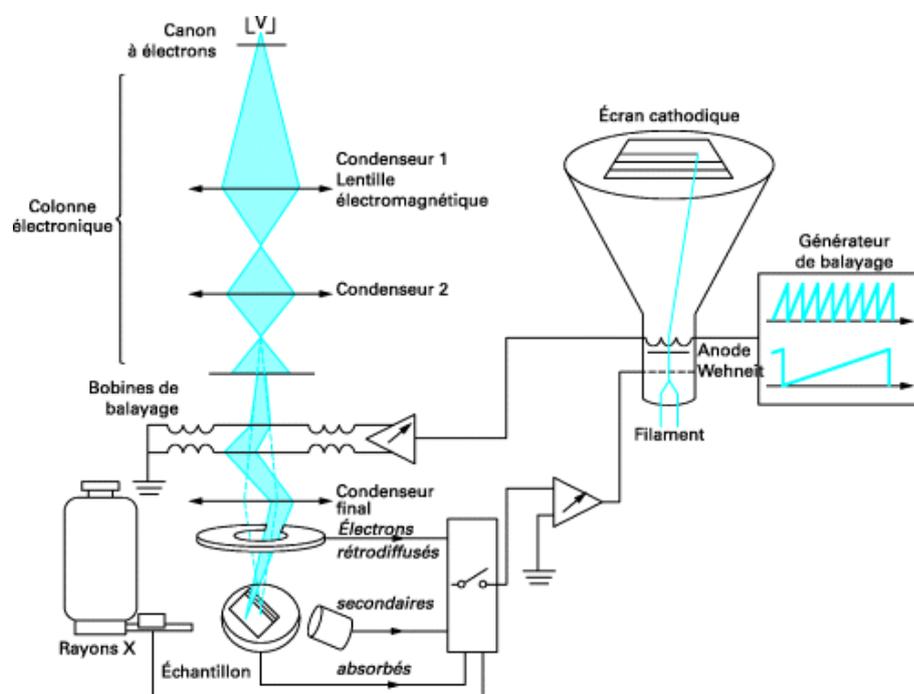


Figure A 2 : Principe de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage (Ruste 2013)

Microscopie électronique à transmission

Très proche du MEB, la microscopie électronique à transmission (MET) permet d'obtenir une cartographie d'une section transverse d'un échantillon mince conducteur (**Figure A 3**). Un canon à électron permet là aussi d'obtenir un faisceau d'électrons incident guidé jusqu'à l'échantillon par un assemblage de lentilles et diaphragme. Après avoir traversé l'échantillon, les électrons sont séparés en électrons transmis : n'ayant pas interagi avec l'échantillon, et en électrons diffusés et diffractés : élastiquement sans perte d'énergie, ou inélastiquement avec perte d'énergie (**Figure A 1**). Un diaphragme placé derrière l'échantillon, appelé diaphragme objectif, ou de contraste permet de sélectionner le faisceau transmis (champ clair) ou un faisceau diffracté selon une direction spécifique (champ sombre). Une nouvelle série de lentilles permet de transférer l'image de l'échantillon vers un écran. L'acquisition d'images numériques est au final réalisée par une caméra. En outre, en se plaçant dans le champ focal du faisceau et non dans le champ image, il est possible d'obtenir une figure de diffraction caractérisant les échantillons cristallisés.

Afin d'obtenir des résultats plus probants pour l'étude des CNT, l'utilisation de MET en haute résolution est conseillée. La tension d'accélération dans le canon à électrons est dans ce cas plus intense. En faisant interférer un faisceau transmis et un faisceau diffracté, on obtient une figure d'interférence. Une simulation numérique de cette figure permet d'obtenir une image interprétée de l'échantillon avec une résolution plus fine qu'au MET classique.

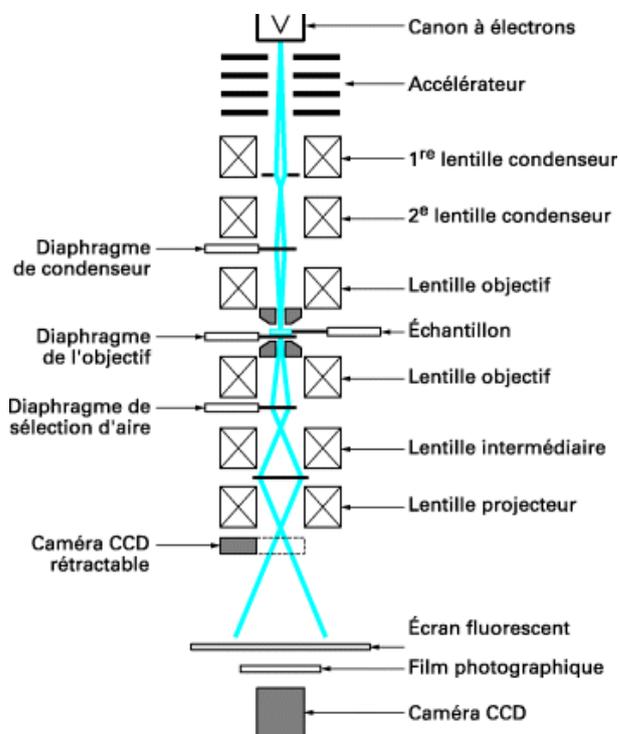


Figure A 3 : Principe de fonctionnement d'un microscope électronique à transmission (Karlík & Jouffrey 2008)

A1.2.3. Surface spécifique

Technique de Brunauer Emmett Teller

La technique de Brunauer Emmett Teller (B.E.T.) permet de mesurer la surface spécifique d'une poudre, c'est-à-dire sa surface par unité de masse. Le principe de cette technique réside dans l'adsorption d'une monocouche d'un gaz connu à la surface de la poudre. On utilise généralement l'Azote, ou pour de plus faibles surfaces le Krypton.

L'échantillon est tout d'abord dégazé à une température moyenne (110°C pour les CNT) afin d'éliminer l'eau ou le CO₂ adsorbés en surface des poudres. L'échantillon est ensuite refroidi dans de l'azote liquide. Le gaz est inséré. L'échantillon est ensuite réchauffé pour libérer le gaz adsorbé. Le volume de gaz libéré est mesuré. De l'isotherme d'adsorption, le volume de la monocouche est alors déduit. De là, découle le calcul de la valeur de la SSa (**Équation A 1**).

$$SSa = \frac{S}{m} = \frac{N_A \times A_g \times n_g}{m} = \frac{N_A \times A_g \times V_g}{m \times V_m} \quad \text{Équation A 1}$$

Avec SSa : surface spécifique de l'échantillon, S : surface de l'échantillon, m : masse de l'échantillon, N_A : le nombre d'Avogadro, et A_g : aire occupée par une molécule de gaz (voir **Figure A 4**), et n_g : quantité de gaz nécessaire pour recouvrir l'échantillon d'une monocouche, calculé comme le rapport de V_g : volume de la monocouche adsorbée (déterminé d'après l'isotherme d'adsorption de B.E.T.) et de : V_m le volume molaire du gaz.

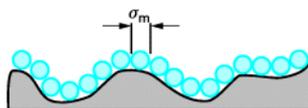


Figure A 4 : Représentation de l'aire occupée par une molécule de gaz en surface de l'échantillon lors d'une mesure B.E.T.

A1.2.4. Composition chimique

Spectrométrie Raman

L'effet Raman permet la caractérisation de la composition moléculaire d'un échantillon de manière non destructive. Il a été découvert en 1928 par Raman et Krishnan (Raman & Krishnan 1928). Lors de l'éclairage d'un échantillon par un faisceau de lumière monochromatique, un spectre de faible intensité peut être observé avec un décalage en fréquence par rapport au spectre de lumière diffusée. Ce décalage correspond aux vibrations des édifices atomiques composant l'échantillon.

Les échantillons ayant une structure basée sur celle du graphite (CNT, NG ou graphène) présentent deux pics principaux sur leur spectre Raman : pic D vers 1340 cm^{-1} et pic G vers 1570 cm^{-1} . Le rapport d'intensité de ces deux pics permet de déduire un taux de défauts de structure, comme expliqué au Chapitre 1, III.3.3. Le pic D est en effet proportionnel au taux de carbone sp^3 donc ne correspondant pas à la structure sp^2 des feuillets de graphite non défectueux (Arepalli 2004; Lehman et al. 2011; Belin & Epron 2005). Le pic G au contraire est indépendant des carbones sp^3 , mais est lié aux carbones sp^2 .

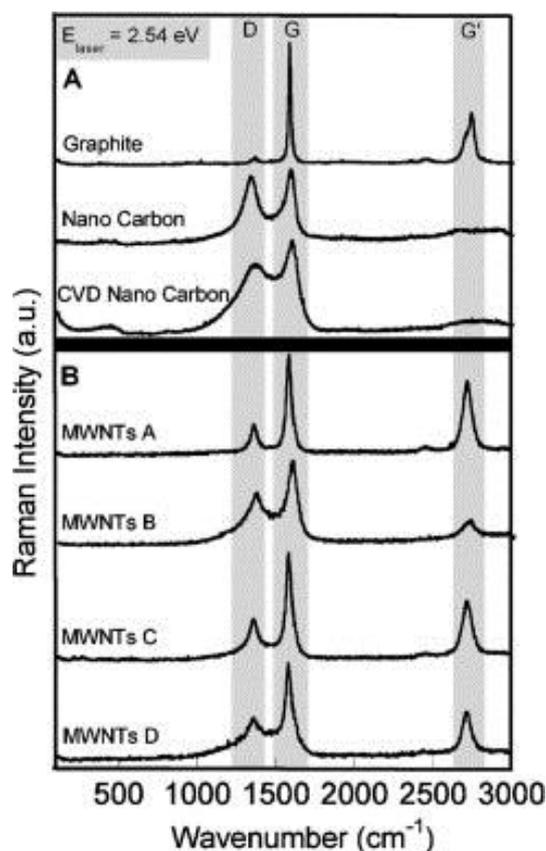


Figure A 5 : Illustration des différences des pics D et G des spectres Raman de nanomatériaux de carbone (Lehman et al. 2011)

Spectrométrie de photoélectrons induits par les rayons X

La spectrométrie de photoélectrons induits par les rayons X (XPS) analyse la composition chimique de l'extrême surface d'un échantillon. Cette technique est basée sur la mesure de l'énergie cinétique E_{cin} des photoélectrons X. Ceux-ci sont émis sous l'effet de l'irradiation d'un échantillon par des rayons X (**Figure A 6**). Suivant la relation de conservation de l'énergie (**Équation A 2**), il est possible de calculer l'énergie de liaison E_l en connaissant l'énergie des photons X incidents (provenant généralement de la raie $K\alpha$ de l'aluminium), et en mesurant l' E_{cin} . Le spectre des E_l des électrons de cœur est spécifique d'un atome, ce qui permet son identification et son dosage dans un échantillon.

$$h\nu = E_l + E_{cin}$$

Équation A 2

Avec $h\nu$ l'énergie du photon incident (rayons X), E_l l'énergie de liaison de l'électron arraché et E_{cin} l'énergie cinétique du photoélectron. En théorie, $h\nu$ est connue, E_{cin} est mesurée, E_l peut donc être calculée.

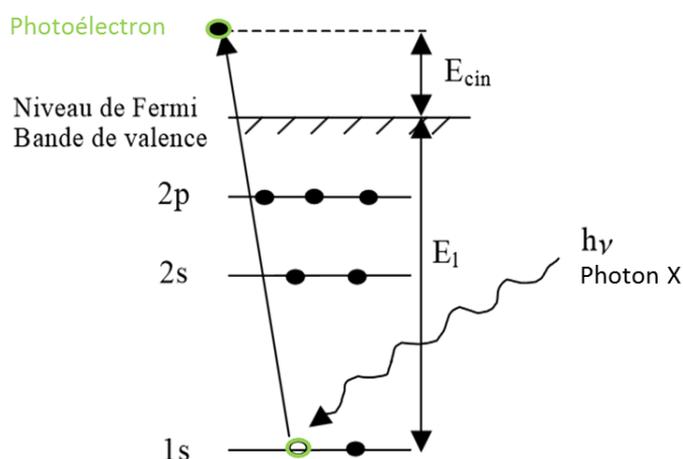


Figure A 6 : Principe de la photoémission (Ekoue 2002)

Le spectre XPS représente l'intensité du signal produit par les photoélectrons en fonction de l' E_{cin} . Le spectre est composé de pics provenant d'une photoémission élastique et d'un fond continu, dû à la participation du processus de photoémission inélastique (perte d' E_{cin} dues aux interactions avec la matière). La position des pics informe sur la nature des éléments chimiques présents en extrême surface de l'échantillon par le biais du calcul de l' E_l . L'intensité des pics est, de plus, fonction de la quantité de l'élément chimique auquel ils se rapportent. Après avoir soustrait le fond continu (généralement par la méthode de Shirley), il est possible de calculer les proportions atomiques relatives (en %) de chaque élément constitutif de l'échantillon analysé. Par exemple la proportion atomique d'un élément A d'un échantillon homogène composé de i éléments peut être calculée selon l'Équation A 3.

$$\frac{N_A}{\sum N_i} = \frac{I_A / (\sigma_A + \lambda_A + T_A)}{\sum I_i / (\sigma_i + \lambda_i + T_i)} \quad \text{Équation A 3}$$

Avec N_x : la quantité de l'élément X, I_x : l'aire sous le pic de l'élément X, σ : la section efficace, λ le libre parcours moyen et T : une constante liée à l'efficacité de la transmission de l'appareil.

La section efficace de photoionisation (σ) est la probabilité d'ionisation du niveau de cœur considéré. Ces valeurs de σ ont été calculées pour la plupart des niveaux électroniques excités par la raie $K\alpha$ de l'aluminium (tables de Scofield). Le libre parcours moyen λ est l'expression de la distance moyenne parcourue par un photoélectron au sein du matériau étudié. La profondeur d'analyse en XPS découle de ce paramètre, lui-même dépendant de l'énergie incidente $h\nu$ des rayons X et de la nature du matériau. Généralement la profondeur d'analyse est d'une dizaine de nm au maximum. En outre, les couches en extrême surface contribuent de manière beaucoup plus importante au signal que les couches plus basses. C'est pourquoi, pour les nanomatériaux, il est nécessaire d'utiliser un support le plus plan possible. Un wafer de silicium est de ce fait un bon choix de support.

Spectrométrie de masse de thermodésorption

La spectrométrie de masse de thermodésorption (TDS) est une technique encore assez peu utilisée. Elle permet pourtant d'obtenir assez facilement des informations précises sur les espèces adsorbées en surface d'un matériau solide. La **Figure A 7** présente le montage d'un appareil de TDS : des pompes assurent un vide poussé au sein de l'enceinte, un tube contenant l'échantillon est chauffé et les gaz extraits sont analysés par un spectromètre de masse en fin de montage.

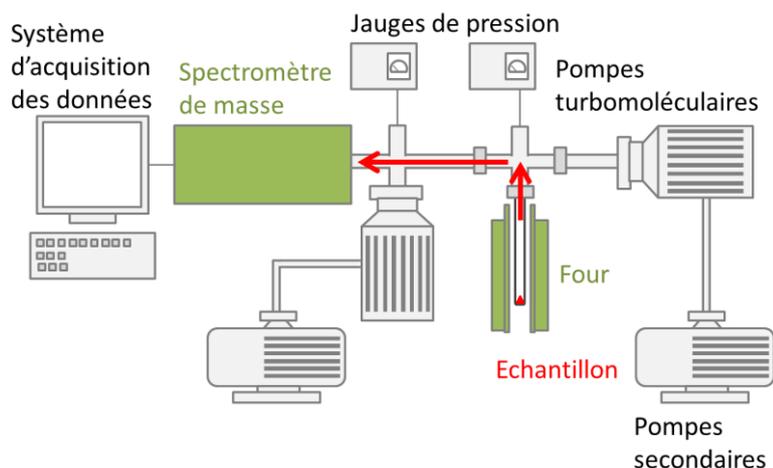


Figure A 7 : Schéma du montage d'un appareil de thermodésorption.

Les liaisons des molécules chimisorbées et physisorbées à la surface du matériau peuvent être rompues par un apport d'énergie thermique. Aux températures correspondant à l'énergie nécessaire pour rompre spécifiquement une liaison moléculaire se créent des pics de pression liés à la désorption de l'espèce moléculaire correspondant. La nature de ces molécules désorbées est analysée par spectromètre de masse. Il est courant de suivre l'intensité du signal en fonction des masses. Néanmoins avec la TDS, l'intensité du signal de chaque masse peut être suivie en fonction de l'évolution de la température. Pour une masse molaire donnée, donc

pour un élément chimique donné, les pics d'intensité correspondent aux températures de rupture des liaisons des molécules comportant cet élément.

L'intensité de ces pics est par ailleurs relative à la proportion de la molécule dans le matériau. Avec un témoin de calibration, il serait donc possible de compléter cette information qualitative, par une information semi-quantitative. Malheureusement un tel témoin n'était pas disponible pour les CNT fonctionnalisés. Cette technique peut de plus être détournée de son usage premier afin de désorber une surface comme utilisé en Chapitre 2.

Spectrométrie par torche plasma

De son nom complet : spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif, l'ICP-AES est aussi une technique d'analyse de la composition chimique d'un matériau. Néanmoins, sa sensibilité est plus fine que celle des techniques précédemment présentées. Il est ainsi possible avec cette méthode de détecter les traces en ppm des impuretés catalytiques des CNT.

L'échantillon est tout d'abord dissous par attaque acide ou par fusion alcaline. Il est nébulisé dans une flamme provenant de la combustion d'un hydrocarbure (**Figure A 8** **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Le nébulisât est alors atomisé dans un plasma excitant les atomes et les ions. Le plasma est un gaz (Argon généralement) porté à très haute température (6000-10 000°C) ce qui permet d'éliminer les interférences chimiques et de rendre accessibles les raies ioniques et atomiques. Lorsqu'ils retournent à l'état fondamental, les atomes et les ions émettent un rayonnement lumineux. Les photons émis dans le domaine UV-visible sont analysés par le dispositif optique. Leurs longueurs d'ondes sont caractéristiques des éléments chimiques présents.

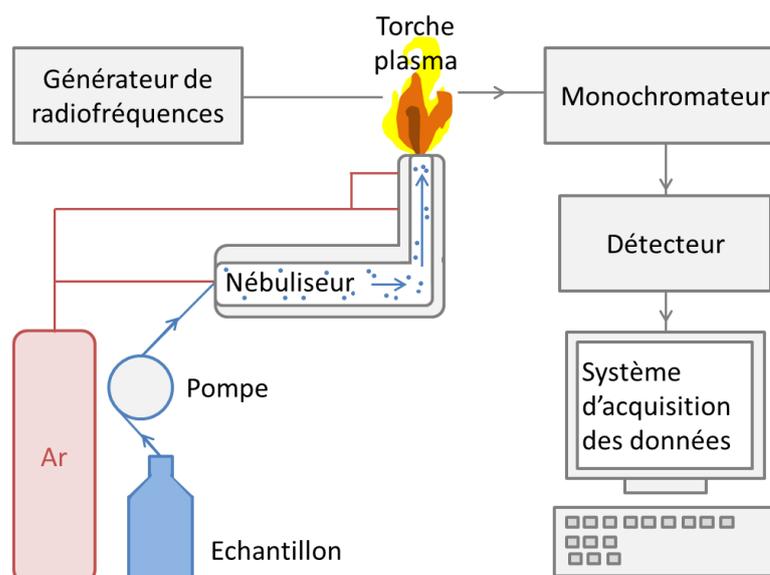


Figure A 8 : Principe de l'ICP-AES

A2.2.5. Diffusion dynamique de la lumière

Dispersion et stabilité

La technique de la DLS permet d'estimer le diamètre hydrodynamique moyen de particules sphériques de diamètre compris entre 1 nm et 3 μm . Les particules en suspension colloïdale dans un solvant se chargent naturellement. On parle de diamètre hydrodynamique lorsque l'espace occupé par la couche ionique interagissant avec la particule est pris en compte.

Afin de mesurer ce diamètre hydrodynamique moyen, un faisceau de lumière focalisé et monochromatique est dirigé sur une suspension colloïdale. Les particules présentes en suspension diffusent la lumière dans toutes les directions. La lumière diffusée est récupérée à un angle de 175° (ou 90° sur l'appareil Zetasizer Nano ZS, Malvern). Son intensité n'est pas constante dû aux déplacements des particules de par le mouvement Brownien. Ce mouvement provient des collisions aléatoires entre les particules en suspensions et le liquide qui les entoure. La technique de la DLS se base sur le lien entre la taille d'une particule et sa vitesse de déplacement (**Figure A 9**).

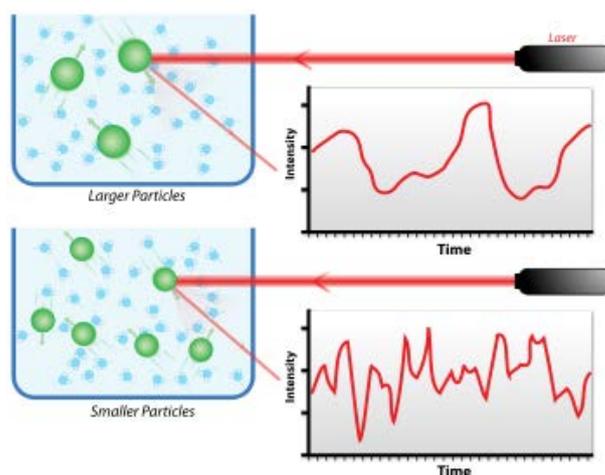


Figure A 9 : Principe de diffusion dynamique de la lumière (image de Mike Jones)

L'équation de Stokes-Einstein (**Équation A 4** $D_H = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{3\pi\eta D}$) définit cette relation. Cependant, elle considère une particule sphérique idéale. Pour les objets non sphériques, comme les CNT, le diamètre hydrodynamique donné sera celui de la sphère de densité 1 de volume hydrodynamique équivalent. Cette mesure est peu pertinente d'un point de vue physique pour les CNT. Cependant, elle reste très utile pour analyser la dispersion des CNT et leur stabilité en étudiant l'évolution de ce diamètre aérodynamique au cours du temps.

$$D_H = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Équation A 4}$$

Avec D_H : le diamètre hydrodynamique, k : la constante de Boltzmann, T : la température absolue, f : le coefficient de friction de la particule, η : le coefficient de viscosité, D : le coefficient de diffusion.

Potentiel zêta

S'il n'est pas possible actuellement de mesurer directement la charge d'une nanoparticule, son potentiel zêta (ζ) en revanche peut être obtenu par un appareil de DLS. Le potentiel zêta tient compte des couches ioniques d'équilibre entre le solvant et la particule, et correspond à la charge au niveau du plan de cisaillement de la particule (**Figure A 10**).

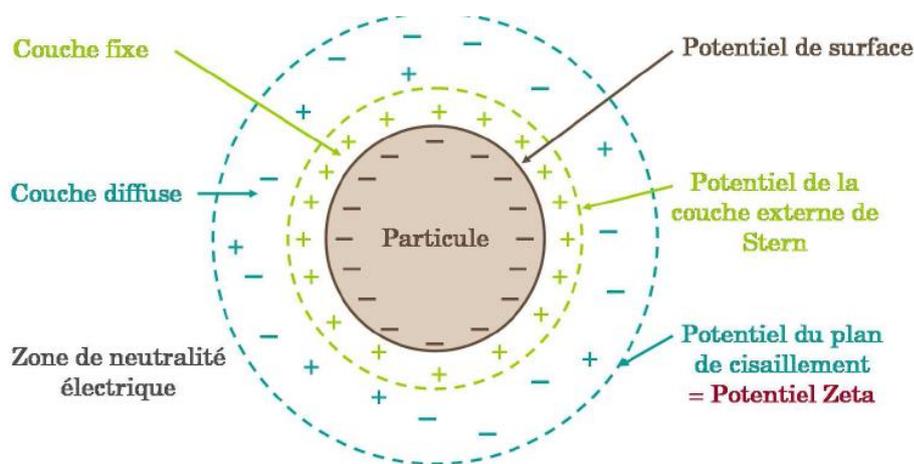


Figure A 10 : Charges et potentiels électriques d'une particule (Simon-Deckers 2008)

Le principe de mesure repose là-aussi sur la détection de la vitesse de déplacement des particules grâce à la diffusion d'un faisceau laser incident. Un champ électrique alternatif est appliqué entre deux électrodes placées aux extrémités d'une cuve de mesure. Les particules chargées migrent sous l'effet du champ électrique. Leur mobilité électrophorétique peut être exprimée en fonction de leur potentiel zêta.

Plus la charge est importante (en valeur absolue) plus l'effet répulsif entre les particules est important. On considère ainsi qu'une suspension colloïdale est stable lorsque $\zeta > |30|$ mV. En effet si le potentiel zêta a une valeur inférieure à ± 25 mV, les forces de répulsion ne sont pas assez importantes pour contrer l'attraction due aux forces de Van der Waals (Fraczek-Szczypta et al. 2012).

Le potentiel zêta est principalement dépendant de la charge de la particule et est très sensible au pH de la suspension. C'est pourquoi, il est souvent plus fiable de mesurer l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH grâce à un titrateur. On peut alors déterminer le point isoélectrique (pI), c'est-à-dire le pH pour lequel $\zeta = 0$ mV.

A1.3. Caractérisation biologique

Cette thèse porte sur la caractérisation des réponses cellulaires aiguës aux CNT. Pour ce faire, nous avons analysé *in vitro* la réponse de la lignée de macrophages murins immortalisés RAW 264.7 à une exposition de 1,5 h à 24 h à différents CNT ou nanomatériaux de carbone. La lignée cellulaire choisie provient de macrophages péritonéaux transformés par le virus AMLV (« Albesson murine leukemia virus », virus leucémique murin d'Albesson). Elle est couramment utilisée pour les tests de toxicité *in vitro* car permet l'obtention de matériel cellulaire en quantité et reproductibilité adéquates.

Le choix de cultiver ces cellules avec du sérum de veau fœtal (FBS pour « fœtal bovine serum ») a été fait afin de ne pas fragiliser les cellules et d'éviter d'exacerber les réponses biologiques. Ce FBS permet de plus, de stabiliser les suspensions de CNT. Les suspensions de CNT sont en effet préparées dans le milieu de culture à la plus forte concentration utilisée pour les tests biologiques et subissent des ultrasons de manière à optimiser leur dispersion. Tous les agglomérats ne sont pas détruits mais la suspension est ainsi homogène et stable sur une semaine. La présence de FBS évite l'ajout d'un autre tensio-actif qui viendrait troubler les réponses cellulaires.

A1.3.1. Doses *in vitro*

Les cellules sont exposées à des doses de 15 à 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CNT. D'après notre état de l'art, il s'agit d'une gamme classique. De plus, cette gamme contient généralement la dose minimale entraînant une réponse biologique pour nos tests de cytotoxicité et de réponse pro-inflammatoire. Il est légitime de se demander si ces doses peuvent correspondre à une exposition pulmonaire humaine vraisemblable. Cependant, de nombreuses approximations doivent être faites pour traduire une dose aiguë à laquelle sont exposées *in vitro* des cellules macrophagiques à une dose correspondant à une exposition *in vivo* chronique. Erdely et al. (2013) a proposé un calcul permettant de lier une exposition humaine mesurée à une exposition *in vivo* sur un modèle murin :

$$\text{Dépôt alvéolaire humain} = \text{concentration en aérosols} \times \text{volume d'exposition} \times \text{durée d'exposition} \times \text{efficacité de dépôt alvéolaire}$$

L'étude d'Erdely et al. a identifié une dose d'exposition moyenne de 10,6 $\mu\text{g.m}^{-3}$ à du carbone élémentaire pour des ouvriers travaillant avec des MWCNT. Les calculs ont été effectués avec des paramètres d'exposition moyens :

$$\begin{aligned} &= 10,6 \mu\text{g.m}^{-3} \times 20 \text{ L.min}^{-1} \times 10^{-3} \text{ m}^3.\text{L}^{-1} \times 480 \text{ min.jour}^{-1} \times 4\% \\ &= 4,07 \mu\text{g de dépôt alvéolaire} \end{aligned}$$

Cette quantité de dépôt alvéolaire a ensuite été convertie pour une souris.

$$\begin{aligned}
 \text{Dose équivalente pour une souris} &= \text{dépôt alvéolaire pour un humain} / \text{surface alvéolaire} \\
 &\quad \text{humaine} \times \text{surface alvéolaire d'une souris} \\
 &= 4,07 \mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1} / 102 \text{ m}^2 \times 0,05 \text{ m}^2 \\
 &= 2 \text{ ng}\cdot\text{jour}^{-1}
 \end{aligned}$$

Afin d'obtenir une réponse directe, les souris ont été exposées 10 jours à des doses de 19,70 ng (équivalent de 0,76 année d'exposition humaine), ou 100 jours à 0,197 μg (équivalent de 7,6 années), ou encore 19 jours à 1,97 $\mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$ (équivalent de 76 ans cumulés).

L'étude de Vietti et al. (2013) effectue le calcul inverse et indique qu'une exposition de 12,5 à 100 μg /poumon de souris correspond à une exposition de 1 à 7,5 mois à une concentration en aérosols de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. Sachant que la surface alvéolaire d'une souris est de 0,05 m^2 environ, les doses de 15,5 à 100 μg /poumon correspondent avec un dépôt cellulaire uniforme à une exposition *in vitro* de 0,025 à 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Des doses de 7,5 à 30 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ont finalement été choisies pour cette étude afin de palier :

1. à un temps moindre d'exposition (aigüe *vs.* chronique)
2. à une distribution irrégulière des CNT dans les poumons
3. à la déposition *in vitro* non parfaite des CNT sur les cellules.

Les doses utilisées dans cette thèse de 15 à 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ correspondent à des doses de 4,7 à 37,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (puits de 0,32 cm^2 , 100 μL par puits). Nous sommes donc bien dans la même gamme que celle utilisée par Vietti et al. Cette dose peut toutefois paraître surestimée par rapport à une exposition industrielle. Cependant, nous avons vu que les mesures d'exposition industrielle sont encore peu nombreuses et très variables entre les études.

A1.3.2. Morphologie cellulaire, coloration MGG

Aussi appelée coloration de Pappenheim, la coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) permet de réaliser de façon usuelle des images en cytologie avec un contraste marqué entre le noyau et le cytoplasme. Deux colorants neutres sont utilisés afin de marquer spécifiquement les éléments cellulaires :

1. Le May-Grünwald est un colorant neutre contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène (sous forme d'éosinate de bleu de méthylène).
2. Le Giemsa contient aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène (sous forme d'éosinate d'azur de méthylène).

Ces colorants sont conservés sous forme de sels en milieu alcoolique, où ils ne sont pas actifs. Ils n'agissent de façon sélective qu'au moment de leur libération en dissolution en solution aqueuse tamponnée. Les éléments cellulaires acides (basophiles) sont colorés par les colorants basiques (en bleu). Les noyaux sont ainsi colorés en violet sombre, et les cytoplasmes

sont rosés ou bleutés selon leur caractéristiques (acidophile : rose clair, basophile : bleu) (**Figure A 11**).

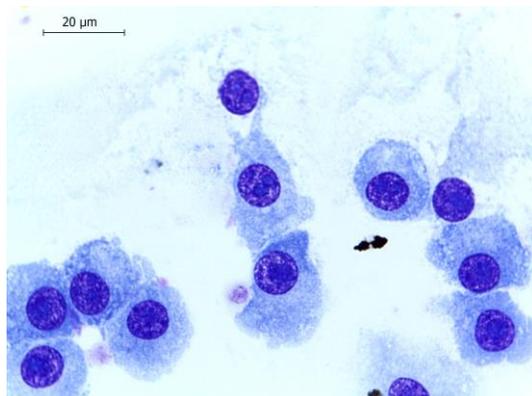


Figure A 11 : Macrophages RAW 264.7 colorés au MGG, observation au microscope optique. Les noyaux apparaissent violet foncé, tandis que les cytoplasmes apparaissent bleu clair témoignant d'une légère basophilie.

A1.3.3. Cytotoxicité, LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme présente dans le cytoplasme des cellules vivantes. En cas de perte de l'intégrité membranaire, c'est-à-dire si la membrane plasmique se rompt, le contenu cytoplasmique est libéré dans le milieu extracellulaire. Le dosage de la LDH relarguée dans le surnageant d'un puits de culture cellulaire peut donc nous informer sur le taux de cellules lysées (mortes), suite à l'exposition à des particules par exemple.

Le principe du test colorimétrique utilisé pour nos études (Cytotox 96® Non-radioactive Cytotoxicity Assay, Promega) est présenté en **Figure A 12**.

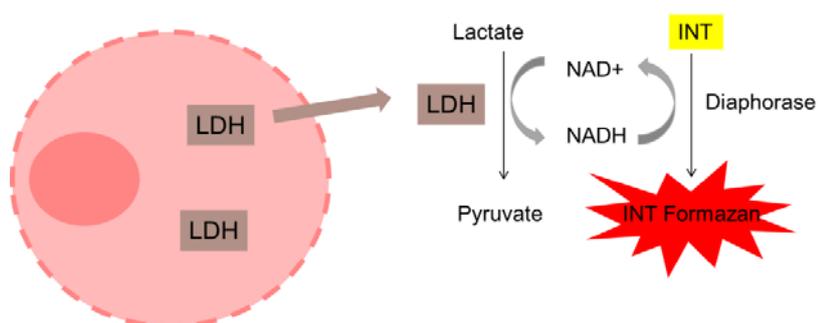


Figure A 12 : Principe du test LDH

La LDH catalyse l'hydrolyse du lactate en pyruvate et entraîne la réduction du NAD^+ en NADH . Le pouvoir réducteur du NADH est utilisé comme réactif limitant dans une seconde réaction catalysée par la diaphorase. Le colorant jaune INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tertrazolium) est transformé en formazan de couleur rouge absorbant à 492 nm.

Afin d'éviter trop de variabilité dans les tests en fonction de l'état primaire des cellules, l'activité de la LDH est mesurée en pourcentage d'un témoin positif. Toutes les cellules de ce témoin sont lysées, donc le taux de LDH correspondant est considéré comme le maximum de LDH pouvant être relarguée (correspondant donc à 100%).

A1.3.4. Réponse pro-inflammatoire, TNF- α

Le TNF- α (« Tumor Necrosis Factor α », facteur α de nécrose tumorale) est une cytokine produite et relarguée dans le milieu extracellulaire en forte quantité lors des premiers stades de phase aigüe de la réponse inflammatoire, témoin d'un état d'activation macrophagique. Elle est dosée à l'aide d'un test ELISA (« Enzyme-linked immunosorbent assay », test immuno-enzymatique), une technique de dosage immuno-enzymatique (**Figure A 13**). Le kit utilisé (Quantikine® Mouse TNF- α , R&D Systems) est constitué :

1. de plaques coâtées avec des anticorps primaires anti-TNF- α ,
2. d'anticorps secondaire anti-TNF- α couplé à l'enzyme « HorseRadish Peroxydase » (peroxydase de raifort, HRP),
3. d'un substrat (solution de tétraméthylbenzidine),
4. d'une solution stop (acide hydrochlorique).

Une quantité adéquate de surnageant du milieu de culture est tout d'abord ajouté dans les plaques coâtées. Après un temps d'incubation permettant la fixation du TNF- α sur les anticorps primaires, les puits sont rincés. Les anticorps secondaires couplés au HRP sont ensuite ajoutés. La plaque est de nouveau incubée le temps que les anticorps secondaires se fixent sur le TNF- α , puis rincée. Le substrat, ajouté dans un troisième temps, se colore en bleu sous l'effet d'une réaction catalysée par le HRP. L'ajout de la solution stop entraîne un changement final de couleur du bleu vers le jaune. La coloration est proportionnelle à la concentration en TNF- α . La détection se fait par lecture de l'absorbance à 450 nm. Les résultats sont exprimés en pg.mL⁻¹ grâce à une courbe d'étalonnage de l'activité du TNF- α réalisée en parallèle.

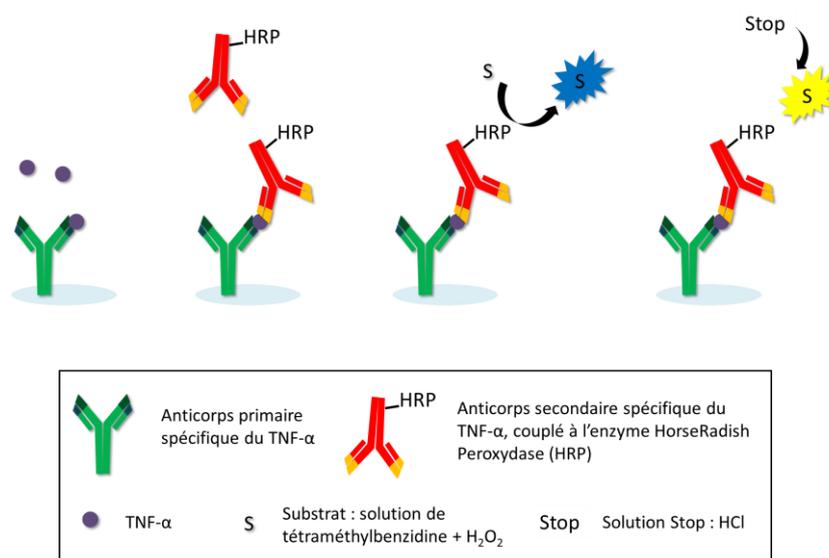
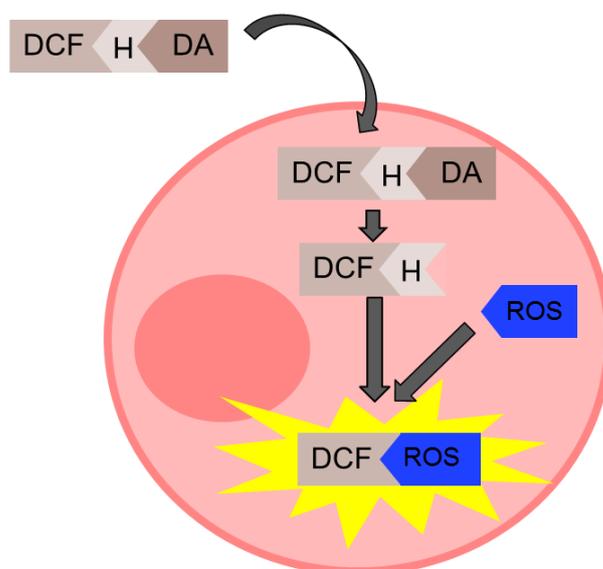


Figure A 13 : Principe du dosage ELISA du TNF- α

A1.3.5. Stress oxydant, ROS

Une des façons de détecter un stress oxydant est de doser les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le test Oxiselect™ ROS Assay Kit (Euromedex) est basé sur l'utilisation d'une sonde intracellulaire le DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate) qui permet d'apprécier une activité radicalaire large spectre. Comme le schématise la **Figure A 14**, le DCFH-DA est capable de traverser la membrane cellulaire. Dans le cytoplasme, il est déacétylé par des estérases cellulaires en DCFH (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine). Ce réactif est ensuite rapidement oxydé par les ROS en DCF fluorescent (2', 7'-Dichlorofluorescéine). Il est alors possible de lire la fluorescence (excitation à 485 nm, émission à 538 nm) et d'exprimer proportionnellement la quantité de ROS en nM de DCF grâce à une courbe d'étalonnage. Un traitement des cellules à 0,1 mM d'H₂O₂ est utilisé comme témoin positif.

**Figure A 14** : Principe du test de détection des ROS au DCFH-DA

A1.3.6. Statistiques

Pour tous les tests biologiques, les essais ont été réalisés en triplicats et répétés 3 fois. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne des 9 valeurs obtenues, avec leur erreur-type. Un test de Student a été appliqué pour déterminer la significativité des différences de résultats (déclarée pour $p < 0,05$).

Seuls les essais réalisés en cytométrie en flux (Chapitre 5) sont présentés avec des erreurs type. Les tests statistiques appliqués sur ces résultats sont le test ANOVA et le test de Bonferroni.

A1.3.7. Cytométrie en flux

Le cytomètre en flux est un appareil permettant le comptage d'objets de petite taille (cellules ou particules par exemple), leur caractérisation et la détection de plusieurs fluorophores. Très brièvement, les cellules sont guidées par un flux de solvant, défilent une par une devant un faisceau laser (ici 488 nm) qui permet de récolter des paramètres de morphologie et d'activer les fluorophores préalablement mis en contact avec les cellules (**Figure A 15**) :

5. Le faisceau diffusé à un angle faible comparé au faisceau transmis (2°) est recueilli dans le canal FSC « forward scatter channel ». Son intensité est proportionnelle à la taille de la cellule,
6. Le faisceau diffusé aux grands angles (90°) est recueilli dans le canal SSC « side scatter channel ». Son intensité est proportionnelle à la complexité de la cellule (granularité et état de la membrane notamment).
7. Les signaux lumineux à des longueurs d'ondes différentes de celle du faisceau incident proviennent de l'excitation des fluorophores et sont recueillis par des capteurs équipés de filtre de bande passante spécifique de la réémission de la fluorescence.

Ce procédé est multiparamétrique et peut atteindre une vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. Les données brutes sont analysées par un logiciel (DiVa™), et les résultats sont généralement présentés sous la forme d'un cytogramme représentant selon deux paramètres choisis chaque cellule sous la forme d'un point (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

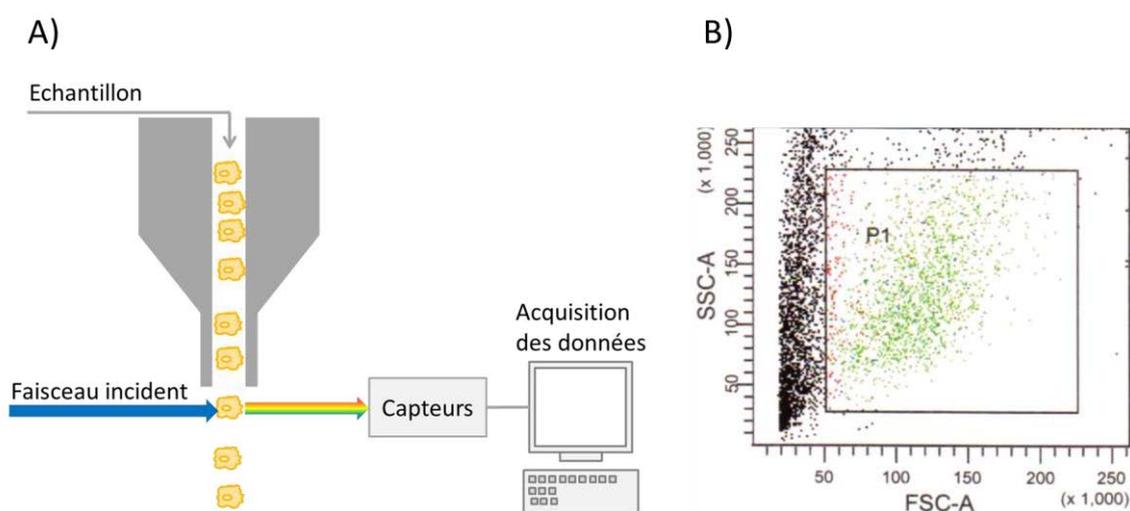


Figure A 15: A) Schéma d'un cytomètre de flux, B) Exemple de cytogramme avec un fenêtrage permettant de sélectionner uniquement les cellules vivantes (en verte)

A2. Différences entre les deux lots de CNT fonctionnalisés à l'acide

Un nouveau lot de MWCNT (Nanocyl NC7000) a été fonctionnalisé suivant un protocole issu de l'étude du Chapitre 2. Le protocole a été modifié pour permettre la fonctionnalisation d'une quantité plus importante de poudre à la fois (**Tableau A 1**).

Tableau A 1 : Comparaison des caractéristiques de la fonctionnalisation acide du lot de CNTf utilisé pour l'article n°1, et du second lot, utilisé pour l'étude approfondie du stress oxydant

	CNTf article n°1	CNTf deuxième lot
CNT (mg)	100	150
Temps de chauffage (h)	6	9
HNO ₃ (mL)	75	120
H ₂ SO ₄ (mL)	25	40

Les rapports de quantité étaient équivalents, mais 3 h de traitement de plus ont été nécessaires afin d'obtenir un taux de groupements acides qui reste inférieur à celui du 1^{er} lot. Les pourcentages atomiques d'oxygène obtenus par XPS étaient en effet de 9% pour le second lot, contre 13% pour le premier lot (**Tableau A 2**). Le point isoélectrique était, de la même manière, plus élevé. Le taux de désordre structural était lui aussi plus faible, suggérant une attaque acide moins importante. Cela pourrait aussi être la raison du diamètre moyen légèrement supérieur à celui des CNTf du 1^{er} lot. La SSA est aussi inférieure à celle des CNTf du 1^{er} lot, signifiant peut-être la présence d'agglomérats plus important de la poudre sèche.

Contrairement aux résultats obtenus avec le premier lot, la production de ROS n'a pas diminué après fonctionnalisation acide (**Figure A 16**). Les autres résultats de toxicité sont cohérents avec nos résultats précédents : pas de changement significatif de la cytotoxicité après fonctionnalisation (**Figure A 17**), et augmentation de la réponse pro-inflammatoire qui reste non-significative ici due au plus faible taux de groupements fonctionnalisés (**Figure A 18**). Nous savons d'après l'article n°1, que la diminution attendue du stress oxydant n'est pas due aux groupements acides. Le deuxième lot de CNTf est bien purifié, donc cela n'explique non plus pas la différence de stress oxydant. Elle pourrait en revanche être expliquée par le taux de défauts de structure moins important lié à un effet « scavenger » moins important.

Tableau A 2 : Récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques du lot de CNTf utilisé pour l'article n°1, et du second lot, utilisé pour l'étude approfondie du stress oxydant

Echantillon	CNT	CNTf article n°1	CNTf deuxième lot
Diamètre (nm)	23 ± 4	16 ± 5	18 ± 5
Désordre structurel (Id/Ig)	0,82	1,83	1,15
SSA (m ² .g ⁻¹)	317 ± 2	279 ± 1	223 ± 3
Impuretés catalytiques (%m.)			
Fe	0,15	0,05	0,02
Al	4,83	0,03	0,02
Co	0,13	0,02	0,01
O pourcentage atomique (%)	9	13	10
Potentiel zêta (mV)	-9 ± 8	-48 ± 2	-29 ± 2
Point isoélectrique (pH)	4,25 ± 0,9	<1,5	2,6 ± 0,1

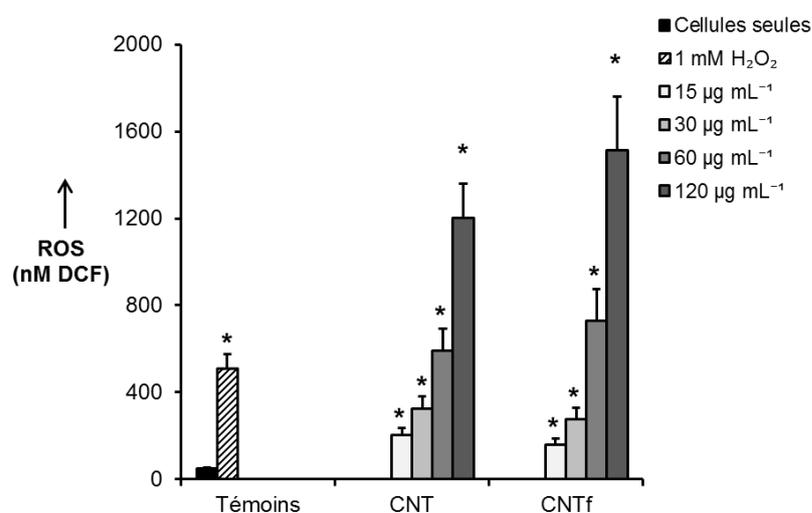


Figure A 16 : Etude du stress oxydant par dosage des ROS après 90 min de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT) et fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$)

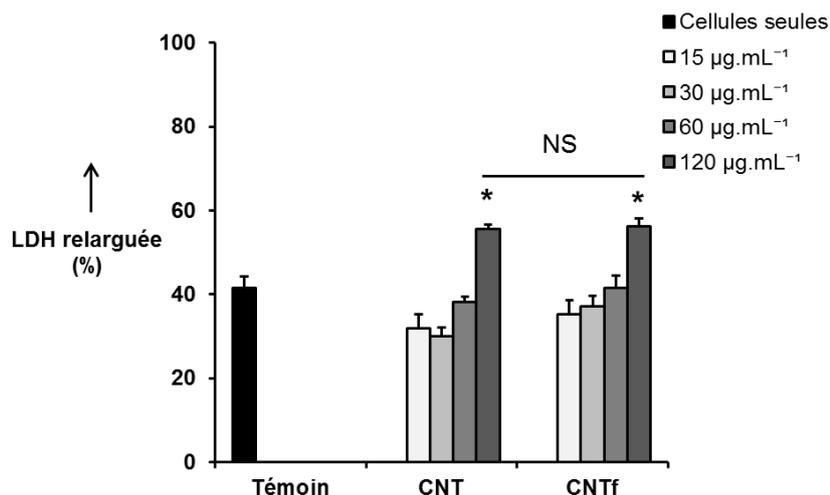


Figure A 17 : Etude de la cytotoxicité par mesure de la LDH relarguée après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT) et fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$), NS : résultats non significativement différents entre les types de CNT.

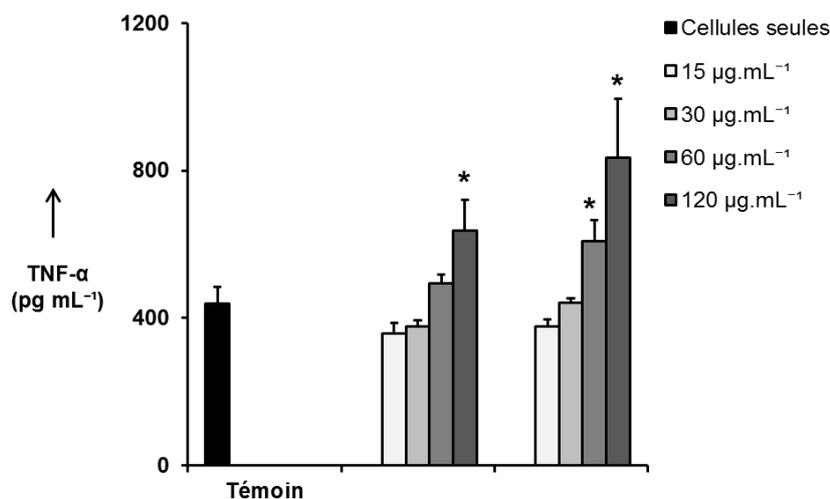


Figure A 18 : Etude de la réponse pro-inflammatoire par dosage du TNF- α après 24 h de contact des macrophages RAW 264.7 à des nanotubes de carbone bruts (CNT) et fonctionnalisés à l'acide (CNTf). * : significativement supérieur au témoin (test de Student, $p < 0,05$).

NNT: *Communiqué le jour de la soutenance*

Agathe FIGAROL

IN VITRO TOXICITY AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CARBON NANOTUBES

Speciality: Process engineering

Keywords: carbon nanotubes, acid functionalization, structural defects, cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress, nano-graphite, carbon black

Abstract:

Due to their exceptional properties, carbon nanotubes (CNT) have aroused a huge interest among in industrial fields such as microelectronics, material science and nanomedicine. Nevertheless, the health impacts of this nanomaterial still remain not well understood. The first toxicological studies pointed out that there is no unique response regarding the health impact of the CNT, but different toxicological profiles according to their various physicochemical properties. A safer by design approach is thus proposed to identify the parameters decreasing from their production the CNT biological impacts. In this context, this work aimed at studying the impact on the *in vitro* response from a macrophage cell line (RAW 264.7) of two post-production treatments: acid functionalization and high temperature annealing.

Surface acid groups from functionalized CNT enhanced the pro-inflammatory response although the cytotoxicity remained stable. On the other hand, acid functionalization, through the elimination of metallic impurities, significantly decreased the oxidative stress. Annealed CNT increased the pro-inflammatory response compared to the pristine CNT. It thus confirmed the sensitivity of this response for the changes in surface chemistry. However, the high temperature annealing did not influence the oxidative stress, despite of the CNT purification. It suggested that structural defects are also of importance for this response. Besides, the acid functionalization of nano-graphite and carbon black displayed trends in the macrophage response similar to the acid functionalization of CNT. The comparison of these three carbon-based nanomaterials seemed to conform to the fibre and platelets paradigm. Eventually, exploratory studies have also been conducted on the interferences between CNT and the toxicity assays, and on the oxidative stress.

NNT : *Communiqué le jour de la soutenance*

Agathe FIGAROL

TOXICITE *IN VITRO* ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE NANOTUBES DE CARBONE

Spécialité: Génie des procédés

Mots clefs : nanotubes de carbone, fonctionnalisation acide, défauts de structure, cytotoxicité, réponse pro-inflammatoire, stress oxydant, nano-graphite, noir de carbone

Résumé :

Les propriétés exceptionnelles des nanotubes de carbone (CNT) attirent de nombreux industriels dans les domaines de la microélectronique, des matériaux ou de la nanomédecine. Néanmoins, le risque sanitaire lié à ce nanomatériau reste encore mal compris. Des profils toxicologiques différents, dépendant des caractéristiques physico-chimiques des CNT, ont été mis en évidence. Une approche « safer by design » est proposée, afin d'identifier les paramètres pouvant, dès la conception des CNT, pour limiter le risque sanitaire. Dans ce contexte, cette thèse avait pour objectif d'étudier l'impact sur la réponse *in vitro* d'une lignée de macrophages murins (RAW 264.7) de deux traitements de post-production de CNT : la fonctionnalisation acide et le recuit haute température.

Les groupements acides en surface des CNT fonctionnalisés ont entraîné une augmentation de la réponse pro-inflammatoire sans influencer significativement la cytotoxicité. D'un autre côté, la fonctionnalisation acide, principalement par l'élimination des impuretés métalliques, a permis de diminuer le stress oxydant. Les CNT recuits à haute température étaient à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire plus importante que les CNT bruts, confirmant la sensibilité de cette réponse biologique à la chimie de surface. En revanche, le recuit n'a pas diminué significativement le stress oxydant malgré la purification des CNT, suggérant l'importance des défauts de structure sur cette réponse biologique. La fonctionnalisation acide de nano-graphite et de noir de carbone a eu un impact similaire à celle des CNT sur l'activité biologique des macrophages. La comparaison de ces trois nanomatériaux fonctionnalisés semble s'accorder avec le paradigme mettant en exergue la toxicité spécifique des fibres et des plaquettes. Enfin, afin de compléter ces résultats, des études exploratoires sur les interférences entre les tests de toxicité et les CNT, ainsi que sur le stress oxydant, ont été conduites.