



Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone

Note d'actualité
État de l'art 2011-2012

Novembre 2012

Édition scientifique





Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone

Note d'actualité
État de l'art 2011-2012

Novembre 2012

Édition scientifique

Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone

Note d'actualité

État de l'art 2011-2012

Novembre 2012

Présentation des intervenants

LISTE DES EXPERTS DU GROUPE DE TRAVAIL

Présidente

Pascale LAUNOIS - Directeur de recherches (CNRS) - Caractérisation et métrologie des nanoparticules.

Membres

Eric GAFFET – Directeur de recherches (CNRS) – Physico-chimie et métrologie des nanomatériaux.

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

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

Catherine MOUNEYRAC – Professeur, Directrice de l'Institut de Biologie et d'Ecologie Appliquée de l'Université catholique de l'ouest (UCO) – Ecotoxicologie.

Jean-Paul SALVETAT – Chargé de recherches (CRPP/CNRS) - Physico-chimie des nanomatériaux.

Anne VAN DER MEEREN - Chercheur (CEA Arpajon) - Toxicologie par voie pulmonaire.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Johanna FITE – Chef de projets scientifiques – Anses.

Contribution scientifique

Johanna FITE – Chef de projets scientifiques – Anses.

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

Secrétariat administratif

Sophia SADDOKI – Anses.

Sommaire

Sommaire	3
Glossaire	5
1 Introduction	7
2 Méthodologie	8
3 Toxicocinétique	9
4 Toxicité des nanotubes de carbone.....	11
4.1 Études in vitro	11
4.1.1 Génotoxicité et cytotoxicité.....	11
4.1.1.1 Tests réalisés sur des cellules A549.....	11
4.1.1.2 Tests réalisés sur des fibroblastes.....	12
4.1.1.3 Tests réalisés sur des lymphocytes	13
4.1.1.4 Tests réalisés sur des macrophages	13
4.1.1.5 Tests réalisés sur des cellules CHO	14
4.1.2 Études complémentaires.....	14
Synthèse relative à la toxicité des NTC <i>in vitro</i>	16
4.2 Études in vivo	18
4.2.1 Étude de la toxicité par voie respiratoire	18
4.2.1.1 Inflammation et lésions pulmonaires.....	18
4.2.1.1.1 Exposition par administration oropharyngée (AOP).....	19
4.2.1.1.2 Exposition par voie intratrachéale (IT) et par inhalation.....	20
4.2.1.2 Effets tératogènes.....	20
4.2.1.3 Génotoxicité	21
4.2.1.4 Approche moléculaire	22
Synthèse relative à la toxicité des NTC <i>in vivo</i>.....	23
5 Écotoxicité des nanotubes de carbone.....	24
5.1 Effets des NTC sur les micro-organismes	24
5.2 Effets des NTC sur les végétaux.....	24
5.3 Effets des NTC sur la croissance, la reproduction, la viabilité et l'élimination chez la daphnie.....	25
5.4 Absorption des NTC chez différentes espèces terrestres et aquatiques	27
5.5 Effets des NTC sur les communautés	27
Synthèse relative à l'écotoxicité des NTC.....	29
6 Les déterminants de la toxicité des nanotubes de carbone.....	31
6.1 Effet de la chimie de surface des nanotubes de carbone.....	31
6.1.1 Les NTC : générateurs de radicaux libres ou antioxydants?	31

6.1.2	Fonctionnalisation	33
6.2	Effet de la taille des nanotubes de carbone	34
6.2.1	Longueur	34
6.2.1.1	Le problème de la mesure par microscopie ou diffusion dynamique de la lumière	34
6.2.1.2	Effets de la longueur sur la toxicité	35
6.2.2	Diamètre.....	35
6.3	Effet de l'état de dispersion	35
Synthèse sur les déterminants de la toxicité		37
7	Conclusions.....	39
8	Références bibliographiques	41

Liste des annexes

Annexe 1 : Tableau d'analyse des articles.....	44
Annexe 2 : Techniques de laboratoire	52

Glossaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : *Atomic force microscopy* - microscopie à force atomique

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation

Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Akt : *Protein serine-threonine kinase*, protéine sérine-thréonine kinase, appelée aussi protéine-kinase B (PKB)

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (issue de la fusion de l'ex-Afsset et de l'ex-Afssa)

AOP : Administration oropharyngée

AP-1 : *Activator protein-1*

BOD: *Biological oxidative damage* – dommage oxydatif biologique

CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives

CHO : Chinese hamster ovary - ovaire de hamster chinois

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

CRPP : Centre de recherche Paul Pascal

DCFH(-DA) : Dichlorofluorescein (diacetate)

DLS : *Dynamic light scattering* - diffusion dynamique de la lumière

DMPO : 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide

DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine

DTPA : Diéthylène triamine penta acide

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

EADO : Espèce active dérivée de l'oxygène

EC₅₀ : Concentration efficace médiane - *effective concentration*, 50%

FACS : *Fluorescence activated cell sorter* - trieur de cellules activées par fluorescence

FITC : Fluorescein isothiocyanate

HARN : *High aspect ratio nanoparticles* - nanoparticules à grand "rapport d'aspect" ou facteur de forme

i.p. : Intrapéritonéale

i.t. : Intratrachéale

IL : Interleukine

INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale

IRM : Imagerie par résonance magnétique nucléaire

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LC₅₀ : Concentration létale médiane - *lethal concentration*, 50%

LDH : Lactate déshydrogénase

L_{moy} : Longueur moyenne

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

LSC : *Liquid scintillation counting* - comptage en scintillation liquide

MAPK : Protéine kinase activée par les mitogènes

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique en transmission

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

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B : *Nuclear factor- κ B*.

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

NOEC : *No observed effect concentration* - concentration sans effet observé

NS : Non spécifié

NTC : Nanotubes de carbone

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

$\varnothing_{\text{moy}}$: Diamètre moyen

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase-1

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

PMN : Polymorphonucléaires neutrophiles

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

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SCE : *Sister chromatid exchanges* – échange de chromatides sœurs

SDS : Sodium dodécyl sulfate

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

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

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

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

UCO : Université catholique de l'ouest

US-EPA : *United States Environmental Protection Agency* - Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis

XPS : *X-Ray photoelectron spectroscopy* - spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X

1 Introduction

Parmi les nombreux nanomatériaux existants, les nanotubes de carbone (NTC) constituent une catégorie intéressante en raison de leur potentiel d'applications très vaste et de leurs propriétés exceptionnelles.

Il est possible de décrire simplement la structure d'un nanotube de carbone comme un feuillet de graphène enroulé sur lui-même, formant un cylindre creux simple ou multi-parois (respectivement SWCNT : *single-walled carbon nanotube* ou MWCNT : *multi-walled carbon nanotube*), éventuellement fermé à ses extrémités par des demi-fullerènes¹ ou des structures plus complexes.

Le diamètre moyen ($\varnothing_{\text{moy}}$) des NTC varie du nanomètre (SWCNT) à quelques dizaines de nanomètres (MWCNT), jusqu'à 100 nm. Leur longueur (L_{moy}) varie également de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres, elle peut même atteindre plusieurs mètres dans certains cas [Zheng, 2004 ; Kang, 2005]. Cela leur confère un facteur de forme (rapport longueur sur diamètre) extrêmement élevé. Les NTC font ainsi partie des HARN (*High Aspect Ratio Nanoparticules*).

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

Il existe une grande diversité de NTC et leurs caractéristiques physico-chimiques (état d'agglomération et/ou d'agrégation, composition chimique, taille de particules et distribution, forme, solubilité / dispersabilité, surface spécifique, chimie de surface, densité surfacique de charge) varient selon leur procédé de fabrication (catalyseurs et post-traitements notamment) ou de mise en œuvre.

La toxicité des NTC est étudiée depuis une dizaine d'années, avec des publications concernant en particulier les réponses cellulaires *in vitro* et des études à court terme chez des rongeurs, mais aucune donnée épidémiologique n'est disponible. Les études *in vitro* et *in vivo* mettent notamment en évidence des effets terratogènes (voir § 4), sources de préoccupations pour la santé humaine.

Dans le domaine écotoxicologique, peu d'études permettent de déterminer l'impact potentiel des NTC sur les écosystèmes et les espèces qui les peuplent. Or, il faut envisager la dissémination des NTC dans tous les milieux de l'environnement (eau, air, sol), à chacune des étapes de leur cycle de vie (conception, production, utilisation et fin de vie de produits finis). Par conséquent, il est nécessaire d'étudier les risques sur la composante biologique des milieux réceptacles et concentrateurs de pollution que sont le compartiment aquatique et le sol (voir § 5).

¹ **Fullerène** : molécule à symétrie icosaédrique composée de 60 atomes de carbone.

2 Méthodologie

L'identification des articles dans les revues avec comité de lecture et ayant trait à la toxicité et à l'écotoxicité des nanotubes de carbone a été réalisée à partir d'une analyse de la littérature scientifique. Les bases de données couramment utilisées pour ce type de recherche (notamment *PubMed*, *Web of knowledge* et *Scopus*) ont été utilisées.

Cette note est une mise à jour thématique du précédent état de l'art sur la toxicité et l'écotoxicité des nanotubes de carbone [Anses, février 2011]. L'objectif n'est pas de broser le tableau le plus large possible des connaissances disponibles sur les NTC, mais d'identifier ici les connaissances nouvelles d'intérêt, susceptibles d'éclairer les résultats de l'expertise de l'évaluation des risques liés au GRAPHISTRENGTH C100 [Anses, mars 2012].

Ainsi, ont été considérés les articles publiés depuis 2011 et traitant de la toxicité ou de l'écotoxicité des MWCNT (car le GRAPHISTRENGTH C100 est un MWCNT), à l'exception de quelques articles d'intérêt sur les SWCNT ou antérieurs à 2011.

Les publications ne montrant pas une caractérisation physico-chimique suffisante du matériel utilisé ont été écartées de cet état de l'art.

Parmi tous les articles publiés, les experts ont sélectionné ceux qui leur paraissaient les plus pertinents, notamment sur les effets par inhalation (voie d'exposition majoritaire aux NTC), sur les effets génotoxiques, ou l'écotoxicité.

Au total, 29 articles ont été étudiés, dont :

- 1 article sur la toxicocinétique des NTC,
- 19 articles sur la toxicité des NTC : 9 études *in vitro* et 12 *in vivo* (dont 1 revue et 2 articles à la fois *in vitro* et *in vivo*),
- 9 articles (dont 3 revues) sur l'écotoxicité.

Par ailleurs, les experts se sont particulièrement intéressés aux caractéristiques physico-chimiques des NTC déterminant leur toxicité ou leur écotoxicité.

Le contenu des différents articles scientifiques et de revue étudiés a été résumé et des synthèses ont été rédigées dans chaque partie du rapport.

3 Toxicocinétique

Les voies d'expositions potentielles aux nanoparticules sont l'inhalation, l'ingestion, le contact cutané et la voie parentérale (dans les situations d'applications biomédicales).

Le précédent état de l'art sur les nanotubes de carbone [Anses, 2011] indiquait que les NTC pouvaient pénétrer dans les cellules selon les différents mécanismes connus : la phagocytose², l'endocytose³ et la diffusion⁴.

L'étude de Lacerda *et al.* (2012) vient étayer ces informations. Les auteurs ont examiné *in vitro* les mécanismes par lesquels des nanotubes sont internalisés dans la cellule. Deux modèles cellulaires ont été utilisés : une lignée de cellules épithéliales humaines A549 (carcinome pulmonaire) et une lignée de macrophages de souris RAW 264.7, les seconds étant habituellement considérés comme étant les cellules les plus impliquées dans les phénomènes de phagocytose.

L'étude se place dans le cadre de l'utilisation de NTC pour l'administration de médicaments, et les auteurs ont utilisé exclusivement des NTC fonctionnalisés (aminés / carboxylés). Les caractéristiques de ces NTC (50 et 100 µg/L) sont décrites dans des publications précédentes (*cf.* Annexe 1). Il s'agit de MWCNT de 20-30 nm de diamètre externe et 0,5-2 µm de long. Pour certaines études, les NTC ont été marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) pour assurer la détection intra-cellulaire quantitative des NTC par leur fluorescence (analyse en cytométrie de flux). Les NTC ont été dispersés dans le milieu de culture en l'absence de sérum, mais la publication ne détaille ni les modalités ni l'état de dispersion des NTC.

Les auteurs ont formulé l'hypothèse selon laquelle 2 voies d'internalisation des NTC par les cellules sont possibles :

- une voie d'endocytose, requérant de l'énergie et reposant sur plusieurs mécanismes spécifiques possibles (endocytose clathrine -ou cavéoline- dépendante, micropinocytose, phagocytose) ;
- une voie de diffusion passive, ne requérant pas d'énergie (aussi appelée « nanopénétration » par d'autres auteurs).

Une gamme de traitements (4°C, appauvrissement en K⁺, privation d'énergie) et d'inhibiteurs pharmacologiques (chlorpromazine, philipine III, amiloride, génistéine, cyclodextrine) ont été utilisés pour tenter de dégager une voie préférentielle d'internalisation des NTC. La présence intracellulaire des NTC a été objectivée par 3 méthodes complémentaires, le tri de cellules par fluorescence (FACS, *Fluorescence activated cell sorter*), la microscopie confocale et la microscopie électronique.

Les résultats indiquent qu'une part importante des NTC retrouvés dans le cytoplasme, estimée à 30-50 %, proviendrait d'un processus de diffusion passive parce qu'apparemment non-inhibée en l'absence d'énergie et toujours active en présence d'inhibiteurs

² La **phagocytose** est une forme d'endocytose caractérisée par l'adhésion, l'ingestion et éventuellement la digestion de particules de diamètre microscopique, puis par le rejet des déchets. Elle concerne en général des bactéries et particules solides.

³ L'**endocytose** (ou internalisation) a lieu quand une partie de la membrane cellulaire entoure complètement une particule et la fait pénétrer de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

⁴ Le passage des particules à travers la membrane plasmique peut se faire par **diffusion simple** ou passive (dans le sens des concentrations fortes vers les concentrations faibles, jusqu'à équilibre des concentrations de part et d'autre de la membrane). Ce type de passage n'est possible que si la molécule est « soluble » dans la membrane phospholipidique, c'est-à-dire qu'elle peut traverser directement la bicouche de phospholipides de la membrane plasmique. La molécule doit donc être hydrophobe (apolaire) ou, si elle est hydrophile (polaire), être suffisamment petite (ex : éthanol).

pharmacologiques de l'endocytose. D'après les auteurs, ces résultats tendraient à soutenir la possibilité d'utiliser des NTC pour le transfert intracellulaire de molécules d'intérêt, car ces mécanismes de diffusion passive n'impliquent pas l'association de phénomènes de dégradation, comme par exemple dans les phagolysosomes [Lacerda *et al.* ; 2012].

Ces observations restent néanmoins fragmentaires et méritent d'être largement complétées avant de pouvoir disposer d'une compréhension correcte des phénomènes impliqués.

Aucun élément nouveau sur la distribution dans l'organisme, la biopersistance et l'excrétion des NTC n'a été mis en évidence dans l'actuelle mise à jour de l'état de l'art (pour en savoir plus, voir [Anses, 2011]).

4 Toxicité des nanotubes de carbone

L'étude des effets biologiques des nanotubes de carbone est une tâche complexe, en raison de la diversité des caractéristiques (taille, forme, état de surface, fonctionnalisation⁵, etc.) des nanotubes existants, qui peut influencer leurs effets biologiques.

Les études sur cellules vivantes en culture (tests dits « *in vitro* ») (voir § 4.1) sont une étape indispensable car elles permettent de tester un très grand nombre de conditions, de cellules et de NTC. Elles sont utiles pour déterminer les mécanismes d'action au niveau cellulaire et moléculaire et pour appréhender les caractéristiques des nanoparticules susceptibles d'agir sur l'homme et l'environnement.

Les études *in vivo* (voir § 4.2), quant à elles, permettent d'étudier les effets biologiques des nanotubes de carbone sur l'animal entier (rats, souris ou lapins notamment).

Afin d'étudier la toxicité des nanotubes de carbone, dix-sept articles scientifiques ont été pris en compte et sont étudiés ci-après (dont huit études *in vitro* et neuf études *in vivo*).

Les expérimentations sont détaillées dans le tableau d'analyse des articles en Annexe 1.

4.1 Études *in vitro*

4.1.1 Génotoxicité et cytotoxicité

4.1.1.1 Tests réalisés sur des cellules A549

Quatre publications portant sur des cellules épithéliales de carcinome pulmonaire humain A549 ont été étudiées [Corradi *et al.* 2011 ; Cavallo *et al.* 2011 ; Thurnherr *et al.* 2011 ; Kato *et al.* 2012].

Dans l'étude de Corradi *et al.* (2011), le test du micronoyau (cf. Annexe 2) a été appliqué à plusieurs nanoparticules, avec pour objectif de déterminer l'effet du sérum présent dans les milieux de culture des cellules de carcinome pulmonaire humain (A549). Les concentrations en MWCNT employées allaient de 50 à 250 µg/mL. Les auteurs n'ont pas été en mesure d'obtenir de résultat avec ces MWCNT, en raison de la formation d'agglomérats qui gênaient l'observation en microscopie optique, quelle qu'ait été la méthode de préparation des MWCNT, avec ou sans sérum. Toutefois, les auteurs ont noté que la morphologie des cellules n'était pas altérée par les nanotubes, quelle que soit la concentration en sérum. De même, l'indice de blocage de la prolifération (paramètre déterminé pour le test du micronoyau avec blocage de la cytokinèse) n'était pas modifié. Ces données indiquent que ces MWCNT n'ont pas provoqué de toxicité, dans les conditions expérimentales de l'étude [Corradi *et al.*, 2011].

Utilisant le même test et le même type de cellules, Kato *et al.* (2012) ont observé une augmentation significative, dose-dépendante (20, 100 et 200 µg/mL), de la formation de micronoyaux. Ces auteurs ne mentionnent pas d'agglomération des NTC. Pour ce test, les nanotubes étaient dispersés dans le milieu de culture contenant 0,005 % (concentration finale) de Tween-80 [Kato *et al.*, 2012]. Il semble que les différences de résultats entre ces deux études peuvent s'expliquer, au moins en partie, par des différences d'état de dispersion des NTC.

Cavallo *et al.* (2011) ont employé des concentrations de NTC plus faibles, de 5 à 100 µg/mL, pour étudier les effets génotoxiques au moyen du test des comètes (cf. Annexe 2). Une

⁵ La **fonctionnalisation** consiste à greffer une fonction (citrate, thiols, phosphonates, tensioactifs, polymères, etc.) aux nanoparticules afin de leur conférer de nouvelles propriétés (dispersion en milieux aqueux et non aqueux, applications en imagerie médicale, etc.).

augmentation significative de la valeur d'un paramètre des comètes (pourcentage d'ADN dans la queue de la comète) a été observée avec 10 µg/mL, à tous les temps d'incubation avec les MWCNT (2h, 4h et 24h), et dès 5h avec 5 µg/mL. En revanche, il n'a pas été observé d'augmentation de l'oxydation des bases (test Fpg). En outre, ces auteurs ont également étudié la morphologie et la viabilité des cellules A549 en présence de MWCNT. Une internalisation des nanotubes a été constatée. La viabilité n'était pas modifiée quelle que soit la concentration, après 2h et 4h d'incubation [Cavallo *et al.*, 2011].

L'étude de Thurnherr *et al.* (2011) a été réalisée avec des MWCNT Bayer, avec deux types de tests : toxicité aiguë et toxicité dite « à long terme ». Dans la première approche, les MWCNT étaient dispersés avec ajout de 160 ppm de Pluronic F127 ppm ; la mort cellulaire, la production d'espèces actives dérivées de l'oxygène (EADO) et les tests de génotoxicité (comètes et micronoyaux) ont été étudiés (*cf.* Annexe 2). Ces particules se sont révélées peu cytotoxiques (apoptose / nécrose), capables de provoquer une augmentation de la production d'EADO (espèce active dérivée de l'oxygène) par les cellules, et non génotoxiques. Il est à noter que les fibres d'amiante crocidolite utilisées à titre de comparaison n'ont pas montré d'effet génotoxique. Cela pose la question de la signification du résultat pour montrer un potentiel génotoxique dans les conditions de l'étude, et ces résultats doivent donc être interprétés dans ce contexte.

Pour les études à long terme, les MWCNT ont été dispersés avec ajout de 2 mg/mL de PS80, puis centrifugés pour utiliser le surnageant. L'analyse physico-chimique de cette fraction ne semble pas avoir été effectuée. La méthode a consisté à exposer les cellules à une faible concentration de MWCNT (0,5 µg/mL) et à cultiver, par repiquages successifs, les cellules pendant six mois. Des analyses morphologiques ont montré que les MWCNT étaient internalisés par ces cellules. Par rapport aux cellules non traitées, la morphologie des cellules n'était pas modifiée au cours du temps, ni leur production d'EADO en l'absence de particules. Une augmentation d'EADO était observée suite à une nouvelle exposition à des particules [Thurnherr *et al.*, 2011]. Il est dommage que les caractéristiques des cellules, au niveau nucléaire et chromosomique, n'aient pas été déterminées dans cette étude.

La comparaison des conditions expérimentales montre que, dans l'étude de Corradi et al. (2011), les concentrations en NTC employées étaient plus élevées que dans celle de Cavallo et al. (2011), bien que l'on ne puisse pas connaître avec exactitude les concentrations relatives (par rapport au nombre de cellules) de ces deux études. Toutefois, les résultats de ces études suggèrent une faible toxicité des MWCNT, une agglomération dans le milieu de culture, indépendante de la présence de sérum. Un potentiel génotoxique à court terme (cassures de l'ADN, micronoyaux), non associé à une oxydation des bases puriques de l'ADN, a été montré dans deux études [Kato et al., 2012 ; Cavallo et al., 2011]. Dans une autre étude, l'absence d'effet génotoxique doit être considéré en tenant compte des remarques sur l'absence de potentiel de l'amiante crocidolite [Thurnherr et al., 2011].

4.1.1.2 Tests réalisés sur des fibroblastes

Ponti *et al.* (2012) ont effectué des analyses morphologiques sur une lignée de fibroblastes (cellules du tissu conjonctif) de souris Balb/3T3, et déterminé la génotoxicité en appliquant le test du micronoyau (*cf.* Annexe 2) en utilisant différents MWCNT fonctionnalisés –COOH, –OH et –NH₂ ou non. Ils ont également étudié la transformation morphologique, avec un test qui témoigne de l'acquisition de caractéristiques partagées de cellules tumorales (perte de l'inhibition de contact). Les MWCNT ont peu modifié la morphologie cellulaire et se sont montrés peu cytotoxiques. Une interaction entre la membrane cellulaire et les MWCNT non fonctionnalisés et fonctionnalisés –COOH, a été observée, mais pas d'internalisation.

Avec les MWCNT fonctionnalisés –OH et –NH₂, les auteurs ont observé de larges paquets intracellulaires dont certains à proximité du noyau, ainsi que des nanotubes sortant des faisceaux qui pénètrent dans le cytoplasme et le noyau. En termes de génotoxicité, il n'a pas été mis en évidence une augmentation de la fréquence des micronoyaux. En revanche, une augmentation significative de la fréquence de foyers de transformation était observée avec

tous les échantillons, sans relation dose-effet, sauf pour l'échantillon de MWCNT non fonctionnalisés [Ponti *et al.* ; 2012].

Ces résultats suggèrent un potentiel de tous les échantillons à faire progresser les cellules vers un phénotype tumoral. L'absence de relation dose-effet peut être en relation avec l'aptitude des MWCNT à former des agglomérats, ce qui rend hétérogène la dispersion granulométrique et la relation nombre / masse des particules en contact avec les cellules. L'absence de génotoxicité dans le test des micronoyaux suggère qu'un mécanisme, autre que des cassures de chromosomes ou une ségrégation anormale des chromosomes, est associé à la transformation de ces cellules. Les auteurs évoquent un mécanisme épigénétique possible ; ce qui n'exclut pas d'envisager la génération d'altérations structurales ou numériques (aneuploïdie⁶) des chromosomes.

4.1.1.3 Tests réalisés sur des lymphocytes

Deux études portant sur les effets génotoxiques des MWCNT sur cultures cellulaires de lymphocytes humains ont été réalisées [Gosh *et al.*, 2011 ; Catalan *et al.*, 2011].

Ghosh *et al.* (2011) ont appliqué le test des comètes (*cf.* Annexe 2) en exposant des lymphocytes humains à des MWCNT (produits par Sigma) (concentrations employées : 1, 2, 5 et 10 µg/mL ; délai d'incubation : 3h). Ils ont observé une augmentation significative des paramètres des comètes avec une dose de 2 µg/mL, sans relation dose-effet. Il est à noter que les MWCNT ont provoqué peu d'apoptose avec 5 µg/mL, et de la nécrose et de l'apoptose pour des concentrations supérieures [Gosh *et al.*, 2011].

Catalan *et al.* (2011) ont étudié les aberrations chromosomiques (*cf.* Annexe 2) sur des lymphocytes humains exposés à des MWCNT (concentrations employées : 6, 25, 50, 100, 150 et 300 µg/mL). Ces auteurs ont observé une augmentation des aberrations chromosomiques, essentiellement de type cassures, significative pour la concentration de 300 µg/mL, après 48h d'incubation, mais une augmentation non significative était obtenue à 24h. Ils ont également noté que l'observation était gênée par la présence d'agglomérats [Catalan *et al.*, 2011].

*Les conditions expérimentales de ces deux études sont différentes (concentrations des cellules et des particules, durée d'incubation). Si l'on fait une comparaison entre ces conditions, on constate que la durée d'exposition est plus longue, et que les concentrations sont aussi plus élevées dans l'étude de Catalan *et al.* (2011). De même, les concentrations en MWCNT par rapport au nombre de cellules semblent plus élevées dans cette étude. Comme précédemment indiqué, l'état de dispersion des NTC peut expliquer l'absence de relation dose-effet et les différences dans ces études.*

4.1.1.4 Tests réalisés sur des macrophages

Di Giorgio *et al.* (2011) ont réalisé trois types de tests (détection de micronoyaux en condition de cytokinèse bloquée, formation de comètes et d'aberrations chromosomiques, *cf.* Annexe 2) sur des macrophages murins Raw 264.7⁷ exposés à des MWCNT Sigma. Les auteurs ont également réalisé des études morphologiques au MEB (microscope électronique à balayage), à l'AFM (microscope à force atomique) et au MET (microscope électronique en transmission), ainsi que la mesure de la production intracellulaire d'EADO et de la production de TNF-α. Les concentrations en MWCNT étaient différentes pour les différents tests, entre 0,25 et 100 µg/mL.

Les trois tests de génotoxicité ont montré un effet génotoxique caractérisé par une augmentation significative dose-dépendante de la formation de micronoyaux (1, 3 et

⁶ L'**aneuploïdie** caractérise une cellule qui - suite à une mutation - ne possède pas le nombre normal de chromosomes.

⁷ La **lignée Raw** 264.7 est une lignée de macrophages de souris transformés par le virus de la leucémie.

10 µg/mL), une augmentation significative de la formation de comètes (cf. Annexe 2), toutefois non dépendante de la concentration car moindre pour les concentrations les plus élevées, et la formation d'anomalies chromosomiques caractérisées par une aneuploïdie, des cassures de chromosomes et une condensation irrégulière de la chromatine. La production d'EADO était augmentée (concentration testée de 50 µg/mL), mais il n'a pas été mis en évidence de production de TNF-α (à 10 et 50 µg/mL). En parallèle, les études morphologiques au MEB ont montré que les MWCNT n'affectaient pas la morphologie. Les études au MET ont montré une internalisation des MWCNT, avec formation de phagolysosomes et parfois des MWCNT libres dans le cytoplasme, vraisemblablement en raison de la rupture de la membrane du phagolysosome. Des MWCNT ont été également observés au voisinage de la membrane nucléaire. Une faible cytotoxicité des MWCNT a été observée. Des cellules nécrotiques ont été observées après 24h d'incubation avec les nanotubes, à la concentration de 50 µg/mL [Di Giorgio *et al.*, 2011].

Les résultats de l'étude de Di Giorgio et al. (2011) permettent de conclure à un effet génotoxique de ces MWCNT sur ces macrophages, montrant qu'ils provoquent des altérations de l'ADN et des chromosomes et qu'ils affectent l'intégrité de la chromatine.

4.1.1.5 Tests réalisés sur des cellules CHO

Kato *et al.* (2012) ont appliqué le test d'échanges de chromatides sœurs sur des cellules issues d'ovaires de hamster chinois (CHO), classiquement utilisées pour des tests de génotoxicité. Les résultats ont montré une augmentation significative des échanges de chromatides sœurs (voir description de l'essai en Annexe 2), après traitement par des MWCNT, par rapport aux cellules contrôles, dès la concentration de 0,1 µg/mL [Kato *et al.*, 2012].

4.1.2 Études complémentaires

L'étude de Haniu *et al.* (2011) porte sur l'internalisation de MWCNT, la cytotoxicité, la production d'espèces actives dérivées de l'oxygène (EADO) et de cytokines (sur THP-1). Elle a été réalisée sur quatre types différents de cellules, dont une a été différenciée. Il s'agit de lignées humaines : mésothéliome (MESO-1), monocytes de leucémie (THP-1) différenciés ou non en macrophages (après traitement au 12-myristate phorbol-13 acétate), lignée de neuroblastome (IMR-32) et lignée de cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B).

Une phagocytose par les cellules MESO-1, BEAS-2B et THP-1 différenciées a été observée, associée à une localisation périnucléaire des MWCNT. En revanche, les autres types cellulaires montraient peu d'internalisation. La phagocytose a été confirmée en présence de cytochalasine (absence d'internalisation dans ces conditions). Une cytotoxicité est observée pour des concentrations de 50 et 100 µg/mL. Les cellules THP-1, différenciées ou non différenciées ont produit les cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-6 en quantité plus importante. Une diminution de la production d'EADO a été observée dans les cellules traitées par les CNT comparativement aux cellules non exposées (sauf avec les cellules IMR-32) [Haniu *et al.* ; 2011].

L'étude de Haniu et al. (2011) souligne une internalisation différentielle des MWCNT selon le type cellulaire. Les raisons de ces différences sont difficiles à déterminer. Il faudrait tenir compte de l'état de dispersion des nanotubes dans les différents milieux de culture qui pourrait éventuellement être différente. Toutefois, les spécificités des différents types cellulaires sont certainement à prendre en compte. On notera que cette étude a montré une diminution significative de la production d'EADO dans les cellules exposées, par rapport à celles non exposées.

Thurnherr *et al.* (2011) ont employé des cellules lymphocytaires humaines Jurkat⁸ (en outre, les cellules étaient transfectées avec le gène NEO, leur conférant une résistance à la Néomycine) et les ont exposées à des MWCNT (produits par Bayer), dans une étude « à

⁸ La lignée cellulaire **Jurkat** est une lignée issue de lymphome de lymphocyte T humain.

long terme » (6 mois). La méthodologie est identique à celle mise en œuvre avec les cellules pulmonaires A549 (voir § 4.1.1.1). Les analyses morphologiques ont montré que les MWCNT étaient peu internalisés par ces cellules. Par rapport aux cellules non traitées, la morphologie des cellules exposées n'était pas modifiée au cours du temps [Thurnherr *et al.* ; 2011].

Synthèse relative à la toxicité des NTC *in vitro*

La présente synthèse sur la toxicité des NTC *in vitro* est une mise à jour de l'état de l'art précédent [Anses, 2011]. En tout, 9 nouveaux articles portant sur la génotoxicité ont été étudiés.

Génotoxicité

Le précédent état de l'art sur les NTC [Anses, 2011] avait permis de mettre en évidence des effets génotoxiques (mutagènes, clastogènes et aneugènes) potentiels des MWCNT sur les cellules eucaryotes, que ce soit des cellules épithéliales [Karlsson *et al.*, 2008 ; Yamashita *et al.*, 2010 ; Muller *et al.*, 2008 ; Muller et Decordier, 2008], des cellules conjonctives [Patlolla *et al.*, 2010] ou des macrophages [Migliore *et al.*, 2010].

La présente mise à jour a permis d'apporter de nouveaux résultats qui vont dans le même sens.

De nouvelles études de génotoxicité, portant sur différents types cellulaires (cellules épithéliales, fibroblastes, cellules de type macrophage) ont été publiées. Au total, 9 études ont été analysées dans ce rapport, utilisant parfois plusieurs types cellulaires ou un seul type et plusieurs tests.

Les résultats ont montré :

- des effets génotoxiques dans la majorité des études, le plus souvent caractérisés par des cassures d'ADN (tests des comètes et des micronoyaux) et des aberrations chromosomiques ;
- des effets le plus souvent observés pour une ou plusieurs concentrations en MWCNT, sans relation dose-effet évidente. Cela est vraisemblablement dû à des raisons techniques, liées aux propriétés d'agglomération des particules, ce qui entrave l'observation en microscopie optique qui est à la base des tests employés. Cet écueil était particulièrement net dans l'étude de Corradi *et al.* (2011), qui n'ont pas pu déterminer les réponses cellulaires en raison de la forte agglomération des MWCNT qui masquaient les cellules ;
- des effets contradictoires quant à la production d'EADO par les cellules exposées aux MWCNT ;
- l'absence d'effet génotoxique dans plusieurs études. Dans l'une d'entre elles, si aucun effet génotoxique n'a pu être détecté, un potentiel transformant (apparition de foyers de transformation morphologique) a été mis en évidence avec des fibroblastes de souris classiquement employés pour des tests d'évaluation d'un potentiel cancérigène [Ponti *et al.*, 2012]. Dans une autre étude, les fibres de crocidolite utilisées comme contrôles positifs n'ont pas montré d'effet génotoxique non plus, ce qui limite la portée du résultat obtenu avec les MWCNT [Thurnherr *et al.*, 2011].

Les données obtenues sur cultures cellulaires sont confortées par les résultats obtenus *in vivo* (voir § 4.2).

Au final, l'ensemble de ces études montre un effet génotoxique des MWCNT dépendant notamment de la concentration d'exposition, du type cellulaire, ainsi que du type de test et du traitement des NTC. Il est donc nécessaire de disposer d'une bonne caractérisation physico-chimique des fibres pour pouvoir relier leurs propriétés à d'éventuels effets. Outre les propriétés spécifiques intrinsèques des NTC, les interactions avec le milieu biologique, en particulier l'adsorption de biomolécules, seraient aussi susceptibles de moduler leur potentiel génotoxique.

Les effets contradictoires parfois observés et la difficulté à mettre en évidence une relation dose-réponse soulignent la nécessité d'une bonne dispersion du produit pour étudier sa toxicité.

En termes de mécanismes, l'effet génotoxique des MWCNT résulte de leur capacité à provoquer des cassures d'ADN, des micronoyaux, des aberrations chromosomiques et / ou une ségrégation anormale des chromosomes sur différents types cellulaires, voire des altérations de l'ADN. La production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote est également un mécanisme reconnu pour rendre compte d'un effet génotoxique, l'origine de ces molécules reste néanmoins à préciser (réactivité de surface et / ou fonction cellulaire ?).

4.2 Études *in vivo*

4.2.1 Étude de la toxicité par voie respiratoire

L'étude de la toxicité respiratoire des NTC est très importante car, chez l'Homme, l'exposition par inhalation représente la voie de contamination par ces nanomatériaux qui engendre le plus de préoccupations. En effet, la voie aérienne est la principale voie d'exposition à ces particules en raison de leurs domaines d'applications. De plus, par leurs dimensions, les NTC se rapprochent des particules atmosphériques ultrafines, ainsi que de l'amiante (responsables de maladies respiratoires) et certaines études ont déjà montré que les effets biologiques des NTC pouvaient être similaires à ceux de ces particules. C'est pourquoi, l'étude de la toxicité des NTC par voie respiratoire a fait l'objet d'une attention particulière dans la présente mise à jour de l'état de l'art précédent [Anses, 2011].

Pour étudier les effets potentiels des NTC (c'est-à-dire, définir le *danger*), ceux-ci peuvent être administrés par instillation directe dans la trachée ou par aspiration pharyngée (cf. § 4.2.1.1.2). Ces dernières années, quelques équipes ont réussi à produire un aérosol de NTC, rendant l'étude de la voie d'exposition par inhalation possible (cf. § 4.2.1.1.2). Le recours à des administrations intratrachéale ou oropharyngée est cependant utile pour mener les premières études, notamment lorsque la quantité de matériau disponible est limitée et que des installations de génération d'aérosols ne sont pas accessibles ou fiables. En outre, le procédé de création de l'aérosol peut modifier l'état de surface des NTC.

Il est en effet admis que les modèles expérimentaux ayant recours à l'injection d'une dose unique sont utiles. Malgré le fait que ces méthodes consistent souvent à injecter une dose massive de matériau dans les poumons, elles offrent une bonne appréhension, au moins qualitative, des effets observés dans les études par inhalation [Henderson *et al.*, 1995 ; Driscoll *et al.*, 2000]. En particulier il est possible de comparer la réponse avec des toxiques pulmonaires de référence comme le quartz ou l'amiante, ou d'apprécier la toxicité relative de différents matériaux.

Les expérimentations sont détaillées dans le tableau d'analyse des articles en Annexe 1.

4.2.1.1 Inflammation et lésions pulmonaires

Une revue de Van der Zande *et al.* (2011) analysant 7 études de toxicité induite par administration pulmonaire de NTC réalisées jusqu'en mars 2010 a été récemment publiée.

D'après les auteurs, les effets systémiques et cancérogènes d'une exposition à des NTC par inhalation restent à démontrer du fait du faible nombre d'études publiées, qui plus est présentant des résultats contradictoires, et de l'absence d'étude de cancérogénèse à long terme par inhalation [Van der Zande *et al.*, 2011]. En effet, sur les deux études visant à étudier le potentiel cancérogène des MWCNT chez le rongeur, l'une n'a pas observé de formation de mésothéliome, alors que l'autre décrit l'apparition de tumeurs. Toutefois, le modèle expérimental choisi dans cette dernière étude est controversé (souris invalidés pour p53 et forte dose de NTC injectés).

Les auteurs soulignent que le mode de contamination est également important, l'inhalation semblant induire une inflammation locale plus importante qu'une administration oropharyngée (AOP).

Les MWCNT semblent également provoquer des mésothéliomes par injection intrapéritonéale.

La totalité des articles analysés ci-après rapportent des dommages inflammatoires et /ou développement de fibroses chez le rat ou la souris après administration de NTC dans les voies respiratoires (six de ces publications concernent des résultats obtenus après AOP, et un article de Morimoto (2011) compare les résultats d'une administration IT et d'une inhalation).

4.2.1.1.1 Exposition par administration oropharyngée (AOP)

Dans l'étude de Wang (2011), les auteurs ont évalué la toxicité de MWCNT administrés chez la souris sous forme dispersée ou non, à des doses allant de 0,5 à 4 mg/kg. Les concentrations en cytokines inflammatoires (IL-1 β) et fibrogéniques (PDGF-AA et TGF- β), ainsi que la quantité de collagène, 21 jours après exposition, sont globalement plus importantes lorsque les NTC sont dispersés. Les auteurs attribuent cette différence à une phagocytose plus importante dans le cas d'administration de NTC non dispersés. Dans cette étude, des lignées cellulaires ont été également utilisées. Les NTC dispersés entraînent une augmentation de la cytokine proinflammatoire IL-1 β par la lignée macrophagique THP-1, et une augmentation de production de TGF- β par la lignée épithéliale BEAS-2B [Wang Xiang, 2011].

L'influence de la taille a été étudiée par deux groupes [Fenoglio, 2012 ; Mühlfeld, 2011]. Chez le rat, Fenoglio *et al.* ont utilisé des NTC de diamètres différents à la dose de 8 mg/kg. Ces deux types de NTC diffèrent également par leur forme : les tubes de faible diamètre sont courbes alors que ceux de gros diamètre forment des aiguilles. Dans cette étude, les auteurs montrent une phagocytose par les macrophages alvéolaires, identique pour les deux types de NTC. Toutefois, les NTC de faible diamètre induisent, trois jours après l'AOP, une toxicité (évaluée via l'activité de la lactate déshydrogénase, LDH) et un stress oxydant supérieurs à celle des NTC de diamètre plus élevé [Fenoglio, 2012].

Dans leur étude chez la souris, Mühlfeld *et al.* ont utilisé des tubes longs (13 μ m) ou courts (1-5 μ m) à la dose de 0,4 mg/kg. Les effets décrits à J1 ou J28 après AOP de tubes longs sont une augmentation de cytokines proinflammatoires (TNF- α et IL-6) produites par les macrophages, ainsi qu'une hypertrophie des pneumocytes II, alors que les tubes courts provoquent une augmentation de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) et un développement de foyers de fibrose. Toutefois, il est à noter que les NTC ne diffèrent pas seulement par leur longueur, mais également par leur contenu en fer, et leur diamètre, ceci rendant difficiles les conclusions portant seulement sur un effet longueur [Mühlfeld, 2011].

Ronzani *et al.* (2012) ont comparé une AOP unique ou répétée (J0, J7 et J14) chez la souris. Pour cette étude, les quantités administrées sont de 0,06, 0,25 et 1 mg/kg. Les auteurs montrent 1 jour après l'administration unique ou 7 jours après la dernière administration dans le cas d'une administration répétée (soit 21 jours après la première) une inflammation qui diffère sur quelques critères. L'administration unique induit une augmentation des neutrophiles dans le LBA, ainsi que de TNF- α , des chimiokines KC et IL-17. L'administration répétée entraîne une augmentation de neutrophiles mais également de macrophages et d'éosinophiles. La présence de granulomes est notée. La présence de NTC dans les macrophages alvéolaires, les pneumocytes de type II et les neutrophiles infiltrés est soulignée [Ronzani *et al.* ; 2012]. Il est difficile de conclure sur la seule influence du protocole d'administration (administration unique ou répétée) sur ces différents paramètres du fait également de la différence du moment des observations (au bout de 1 ou 21 jours).

Une autre étude sur l'inflammation pulmonaire comportant en plus un volet physiologique, a montré l'altération des fonctions pulmonaires chez la souris 30 jours après AOP de NTC à 1, 2 et 4 mg/kg. Des infiltrats inflammatoires et des réponses du parenchyme périphérique (granulomes et foyers de fibroses) ont été observés et ont entraîné une altération des fonctions respiratoires (résistance, compliance et élasticité). Des augmentations d'expression des gènes codant pour les chimiokines MIP-1 α et éotaxin, ainsi que d'IL-33 et de MMP-13 ont également été mises en évidence [Wang Xiaojia, 2011].

Enfin, chez la souris, Mercer *et al.* (2011) ont évalué la distribution de MWCNT (0,25 à 2 mg/kg) de 1 à 56 jours après AOP. Une pénétration des NTC dans l'interstitium pulmonaire a été observée très précocement après administration, sans qu'une redistribution ultérieure soit observée (tissus alvéolaires et de la région subpleurale). Les auteurs notent également la formation de granulomes à la plus forte dose, dans lesquels est associée 20 % de la charge pulmonaire en NTC 56 jours après AOP. La majorité de la charge pulmonaire en NTC se trouve dans les macrophages (68%). Toutefois, la clairance pulmonaire n'a pas été

mesurée et de ce fait, l'hypothèse d'une clairance des tubes non phagocytés ou retenus dans les granulomes ne peut être exclue [Mercer, 2011]. Les auteurs comparent les résultats de la présente étude avec des résultats antérieurs obtenus après AOP de SWCNT. Ceux-ci sont peu reconnus par les macrophages et se trouvent à 90 % dans l'interstitium [Mercer et al., 2008]. L'effet fibrogénique des SWCNT, près de 10 fois supérieur à celui des MWCNT, pourrait s'expliquer, selon les auteurs, par une distribution pulmonaire différente.

4.2.1.1.2 Exposition par voie intratrachéale (IT) et par inhalation

L'influence du mode d'administration (IT *versus* inhalation) a été évaluée par Morimoto *et al.* (2011) de 3 à 6 mois après IT et 3 jours à 3 mois après inhalation chez le rat. Une évaluation du dépôt des SWCNT après inhalation (6 h/jour, 5 jours/semaine pendant 4 semaines d'une suspension à 0,37 mg/m³) a été calculée de façon à s'assurer de la cohérence avec la dose administrée par IT (0,66 et 3,30 mg/kg). Après administration IT, des granulomes sont observés, ainsi que des dépôts de collagène, une augmentation du nombre de cellules dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) et de la chimiokine CINC-1. Une inhalation provoque une augmentation des chimiokines de la famille CINC (1 à 3), ainsi qu'une augmentation de myéloperoxydase (MPO), représentative du nombre de neutrophiles, précoce et transitoire. Au niveau pulmonaire, les NTC sont à 70 % sous forme individuelle, ce qui pourrait, selon les auteurs, expliquer l'inflammation moindre par rapport à l'administration par IT [Morimoto, 2011].

Ceci semble contredire les résultats de l'étude de Shvedova (2008), réalisée sur des SWCNT et qui montrait une inflammation supérieure après inhalation par rapport à une AOP chez la souris. Les deux études n'ont pas utilisé les mêmes marqueurs d'inflammation, mais ceci n'explique pas les différences de conclusions de ces deux études.

4.2.1.2 Effets tératogènes

Fujitani *et al.* (2012) ont exploré le potentiel tératogène⁹ de MWCNT chez la souris. Au 9^{ème} jour de gestation, des groupes de souris ont été traités avec une dose unique soit de 2 à 5 mg/kg par voie intrapéritonéale (IP), soit de 3 à 5 mg/kg par voie intratrachéale (IT). Les MWCNT (Mitsui MWCNT-7) étaient dispersés dans une solution aqueuse de carboxyméthylcellulose sodique à 2 %. Les souris ont été sacrifiées au 18^{ème} jour de gestation et les fœtus ont été examinés pour la présence de malformations externes et squelettiques.

Les auteurs ont noté des signes de toxicité maternelle par les 2 voies d'administration, notamment une réduction du gain pondéral (significative au dernier jour pour les 2 plus hautes doses par voie IP et à la plus haute dose par voie IT). Malheureusement, les autres signes de toxicité maternelle n'ont été enregistrés qu'à la fin de l'expérience (9 jours après l'administration) et l'évaluation sous-estime probablement la toxicité présente immédiatement après l'administration.

Les auteurs ont également noté des signes de toxicité développementale (résorption précoce, réduction du nombre de fœtus vivants par nichée et du poids fœtal, malformations externes et squelettiques) dès la première dose de MWCNT (2 mg/kg) par voie IP et dès la deuxième dose (4 mg/kg) par voie IT. Les auteurs concluent qu'il s'agit de la première étude démontrant des propriétés tératogènes des NTC [Fujitani *et al.*, 2012].

Ces conclusions doivent probablement être relativisées en raison de l'existence d'une toxicité maternelle manifeste, probablement sous-estimée parce que mesurée à distance de l'administration, qui ne permet pas de qualifier les anomalies comme résultant d'un véritable effet tératogène. Il est en effet possible que les altérations développementales enregistrées

⁹ **Tératogène** : Se dit de toute substance pouvant provoquer un développement anormal de l'embryon en l'absence de toxicité maternelle.

dans cette expérience soient pour une très large part la conséquence d'une toxicité maternelle.

4.2.1.3 Génotoxicité

Ghosh *et al.* (2011) ont réalisé une étude *in vivo*, pour évaluer la génotoxicité au moyen du test des micronoyaux et des comètes (cf. Annexe 2). Les résultats ont montré une augmentation significative des micronoyaux après injection intrapéritonéale de 2, 5 et 10 mg/kg (24h après injection de la dose finale), ainsi que du paramètre des comètes (pourcentage d'ADN dans la queue) pour les doses de 2 et 5 mg/kg (3h après injection de la dose finale) [Ghosh *et al.* ; 2011].

Kato *et al.* (2012) ont effectué différents types d'études visant à déterminer les effets génotoxiques et mutagènes, après instillation intratrachéale de NTC. Deux types de souris ont été employées ; d'une part des souris IRC, pour évaluer les effets clastogènes (test des comètes) et les adduits à l'ADN dans le poumon, d'autre part des souris génétiquement modifiées (*gtp* delta) pour déterminer le potentiel mutagène.

Chez les souris IRC, 1h après exposition aux doses de 0,05 et 0,2 mg/mL, une augmentation significative des paramètres des comètes (% d'ADN dans la queue et moment de la queue des comètes) a été observée dans les cellules pulmonaires isolées après prélèvement et homogénéisation du poumon. De plus, une augmentation significative de l'oxydation des bases de l'ADN pulmonaire a été observée jusqu'à 3 jours après exposition. Une légère diminution était notée à 7 jours, peut-être en relation avec une réparation partielle des dommages à l'ADN.

Chez les souris *gtp* delta, plusieurs groupes de souris ont été exposées, selon des doses et des nombres d'injection différents, pour des durées d'exposition allant de 8 à 12 semaines post-injection. L'exposition à une dose unique de 8 µg/kg, ou à deux doses (total : 16 µg/kg), n'a pas mis en évidence de mutations du gène *gpt*. En revanche, des mutations ont été observées lorsque les animaux ont été exposés à quatre doses hebdomadaires de 8 µg/kg (total : 32 µg/kg). La fréquence de mutations était significativement plus élevée chez les animaux traités avec les NTC, comparativement aux animaux contrôles (traités par le milieu de suspension des NTC). Le type de mutations a été étudié dans les mutants résistants à la thioguanine. Des transversions GC : CG, non observées dans les cellules issues des animaux contrôles, ont été détectées dans les mutants provenant d'animaux traités. La fréquence de transitions AT : TA était également augmentée.

Chez ces souris traitées par les NTC, une étude immunohistochimique a mis en évidence l'expression de NO synthase et la formation de nitrotyrosine dans les poumons, localisée dans les macrophages et les granulomes, suggérant que le stress oxydatif et la réponse inflammatoire pouvaient être associés au mécanisme de génotoxicité.

Une autre étude rapporte les données obtenues après exposition de rats pas inhalation, en chambre d'inhalation (corps entier), pendant une durée de 5 jours en utilisant une nouvelle méthode de génération de l'aérosol [Kim *et al.*, 2012]. Les auteurs ont déterminé la quantité de H₂O₂ dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et le potentiel génotoxique sur les cellules du poumon, après un délai de 5 jours et 1 mois post-exposition. Les résultats ont montré une augmentation, non significative, de la quantité de H₂O₂. L'évaluation de la quantité de H₂O₂ dans le poumon est une approche de l'évaluation de la réponse inflammatoire et au stress, mais l'extrapolation à la réponse inflammatoire réelle n'est pas connue. Une augmentation du paramètre des comètes (moment de la comète) a été observée. Cette augmentation était significative pour la plus forte dose d'exposition (0,94 mg/m³). Par ailleurs, des nanotubes de carbone étaient détectés dans les macrophages, persistant 1 mois après l'exposition [Kim *et al.*, 2012].

Ces données suggèrent un potentiel clastogène, mutagène et aneugène des NTC utilisés dans ces études. Le stress oxydatif et la réponse inflammatoire pourraient jouer un rôle dans

le mécanisme de génotoxicité, mais leur importance n'est pas bien définie et d'autres éléments paraissent impliqués.

4.2.1.4 Approche moléculaire

Un travail original a été réalisé par Pacurari *et al.* (2011). Les informations apportées par cette recherche ne concernent pas des effets directement observés sur le matériel génétique. Elles renseignent sur les modifications de l'expression de gènes identifiés dans d'autres études comme des marqueurs du cancer du poumon. Ces auteurs ont exposé des souris à des MWCNT, par AOP, à différentes doses (10, 20, 40, 80 µg/souris). Après un délai post-exposition de 7 jours et 56 jours, l'expression de 63 gènes sélectionnés a été étudiée par PCR (qPCR) dans les cellules pulmonaires. La sélection de ces gènes était fondée sur les données de travaux antérieurs les ayant identifiés comme signatures du cancer du poumon humain, ou d'intérêt pour certaines voies de signalisation. Les résultats ont montré une expression différentielle entre les souris traitées et les souris contrôles (milieu de dispersion des MWCNT) similaire à celle observée dans le poumon humain [Pacurari *et al.*, 2011].

Ces travaux sont intéressants et encouragent à développer des études de même type. L'expression différentielle de gènes marqueurs de cancer du poumon suggère un impact des MWCNT, auxquels l'exposition conduit à déréguler l'homéostasie cellulaire, via des voies de régulation impliquées dans le cancer. Ces effets, observés à moyen terme (une semaine), et persistant, pour certains mécanismes, à plus long terme (huit semaines) suggèrent que des modifications physio-pathologiques sont susceptibles d'être stabilisées dans les cellules.

Synthèse relative à la toxicité des NTC *in vivo*

Depuis le précédent état de l'art [Anses, 2011], 12 nouveaux articles portant sur la toxicité *in vivo* des NTC ont été étudiés.

Inflammations et lésions pulmonaires

De cette revue, il ressort que, indéniablement, les NTC (MWCNT) induisent une toxicité pulmonaire se traduisant par l'induction d'un processus inflammatoire et l'apparition de fibroses.

Les critères d'évaluation de la toxicité sont comparables dans la plupart des études. Il s'agit principalement du nombre de cellules inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA), de marqueurs de cytotoxicité (LDH) ou d'inflammation (cytokines et chimiokines) dans le LBA ou dans le tissu pulmonaire, d'observations histologiques (distribution des NTC, présence de granulomes et de foyers de fibroses), et de mesure des dépôts de collagène.

Il ressort également de cette analyse qu'un effort de caractérisation des NTC utilisés pour l'administration a été réalisé par la plupart des équipes. Ces études ont confirmé l'influence des paramètres physiques des NTC et de leur mode de préparation sur la réponse pulmonaire. La plupart des équipes utilisent l'AOP, certes plus physiologique que l'administration IT car entraînant des distributions plus homogènes des NTC, mais ne permettant pas d'administration chronique à faible dose, plus représentative d'une éventuelle contamination du travailleur.

La question de l'influence de la phagocytose des NTC par les macrophages sur le potentiel inflammatoire et / ou fibrosant des NTC semble importante : plus la phagocytose des NTC est importante, moins la fibrose est importante. Ceci souligne le besoin d'études plus mécanistiques.

Enfin, il est à noter que la translocation des NTC vers la région sous-pleurale a été confirmée.

Effets tératogènes

Fujitani *et al.* (2012) ont observé des signes de toxicité développementale chez la souris gestante exposée par voie intrapéritonéale ou intratrachéale. Il est toutefois possible que les altérations développementales enregistrées dans cette expérience soient pour une très large part la conséquence d'une toxicité maternelle.

Génotoxicité

Quatre études, dans trois publications, ont montré un potentiel génotoxique (cassures d'ADN, mutations) [Ghosh *et al.*, 2011 ; Kato *et al.*, 2012 ; Kim *et al.*, 2012].

Une autre publication a démontré, chez des souris exposées à des MWCNT, l'expression pulmonaire persistante (2 mois post-exposition) de gènes identifiés par ailleurs comme étant des biomarqueurs du cancer du poumon humain [Pacurari *et al.*, 2011].

5 Écotoxicité des nanotubes de carbone

À ce jour, peu d'études relevant réellement de l'écotoxicologie des nanotubes de carbone sont disponibles. Le chapitre 5.1 a pour objet de mettre à jour l'état de l'art précédent [Anses, 2011] en s'intéressant particulièrement aux effets des MWCNT sur les micro-organismes, les végétaux, les organismes aquatiques (en particulier la daphnie), et les communautés.

5.1 Effets des NTC sur les micro-organismes

Chung *et al.* (2011) ont étudié les effets à court terme des NTC sur l'activité et la biomasse de micro-organismes vivants dans deux sortes de sols (graminées ou conifères) et contaminés expérimentalement par des MWCNT (15,1 nm, 15 parois) à 3 concentrations (50, 500 et 5 000 µg/g de sol) [Chung, 2011]. D'après Petersen, les deux concentrations les plus élevées sont supérieures à celles probablement présentes dans l'environnement [Petersen *et al.*, 2009].

Un traitement à l'acide nitrique (HNO₃) des NTC a permis de disposer d'une solution aqueuse des MWCNT pour contaminer les sols et augmenter la dispersabilité des NTC.

Différentes activités enzymatiques (phosphatase, 1,4-β-N-acétyl glucosaminidase, 1,4-β-glucosidase, cellobiohydrolase, xylosidase) qui jouent un rôle clé dans la décomposition microbienne de la litière ont été mesurées après 30 minutes, 1, 4 et 11j de contamination des sols. La biomasse bactérienne a été évaluée par mesure du carbone et de l'azote organique.

Une diminution des activités enzymatiques et de la biomasse microbienne a été généralement observée dans les deux types de sols présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes et contaminés par les MWCNT aux concentrations les plus élevées (5 000 µg/g de sol) dès 30 min de contamination et jusqu'à la fin de l'expérience (J+11). Ces résultats suggèrent que des concentrations de 5 000 µg de MWCNT par gramme de sol peuvent exercer une activité antimicrobienne et affecter les cycles des nutriments auxquels participent les microorganismes [Chung, 2011].

Aucune autre étude menée sur d'autres types de sols n'a été identifiée.

5.2 Effets des NTC sur les végétaux

Chez les plantes, les effets des NTC sont contradictoires [revues de Rico *et al.*, 2011, Nair *et al.*, 2010]. À titre d'exemple, chez différentes espèces de plantes (radis, colza, ray-grass, laitue, maïs et concombre), aucun impact sur la germination n'a été rapporté, alors que chez d'autres, une diminution de l'allongement des racines (tomate) ou une augmentation (oignon, concombre) a été observée.

Il semblerait que les interactions (sorption / liaison) entre les NTC et les particules du sol puissent expliquer ces effets [Petersen *et al.*, 2011].

5.3 Effets des NTC sur la croissance, la reproduction, la viabilité et l'élimination chez la daphnie

Trois articles portant sur l'impact des MWCNT vis-à-vis de petits crustacés benthiques¹⁰ (daphnies) ont été étudiés. L'accent a été mis sur l'utilisation d'agents ou de traitements physico-chimiques visant à augmenter la dispersion des MWCNT dans le milieu aquatique.

Alloy et Roberts (2011) ont cherché d'une part à évaluer l'impact de MWCNT stabilisés par la matière organique naturelle (MON) sur la croissance (biomasse corporelle) et la reproduction (nombre de descendants) de daphnies (*Ceriodaphnia dubia* et *Daphnia magna*) et d'autre part, à estimer l'effet du pH sur la toxicité des NTC vis-à-vis de ces mêmes organismes [Alloy et Roberts, 2011].

Les bioessais ont été réalisés en conditions contrôlées (température : 22,5°C, photopériode : 16h à la lumière / 8h à l'obscurité). Les suspensions de MWCNT (NanoAmor, Houston, Texas, USA) ont été renouvelées chaque jour et de la nourriture (*Cerophyll* et *Selenastrum capricornutum*) a été ajoutée après comptage de la mortalité et de la reproduction. Chaque test a été réalisé à 3 pH différents (6, 7 et 8) et de la matière organique naturelle (MON : 15 mg/L) a été ajoutée. Les animaux ont été exposés à des concentrations de 0,5 ; 1,0 ; 2,0 et 4,0 mg/L de MWCNT pour les suspensions à pH = 7 et 1,0 ; 2, 0 ; 4,0 et 10 pour les suspensions à pH = 6 et 8. Les tests de toxicité aiguë (croissance et survie) ont été conduits pendant 96h et ceux de toxicité chronique (reproduction) pendant 7 jours (*C. dubia*) ou 21 jours (*D. magna*), conformément aux procédures de l'EPA (*Environmental Protection Agency – États-Unis*).

Les résultats ont montré un impact négatif des MWCNT sur la croissance et la reproduction des deux espèces de daphnies (*C. dubia*, *D. magna*) étudiées. Ces effets pouvant être expliqués par une diminution de la prise de nourriture par les daphnies exposées aux MWCNT, conduisant ainsi à un déficit nutritionnel. En revanche, aucun effet sur la survie n'a été observé.

Li et Huang (2011) ont étudié l'influence du traitement physico-chimique sur différentes réponses sub-létales (croissance, reproduction, ingestion, défécation) de daphnies (*C. dubia*) exposées en milieu aqueux à des MWCNT. Trois types de MWCNT (diamètre moyen de MWCNT-1, -2 et -3 respectivement de 14,1 ; 34,6 et 59,2 nm) ont été utilisés et traités par l'ozone, les ultrasons et la dispersion mécanique.

Dans les tests de toxicité aiguë, les animaux (*C. dubia*) ont été exposés en continu aux 3 types de MWCNT à des concentrations comprises entre 1 et 200 mg/L pendant 24h selon les procédures de l'EPA. Les paramètres mesurés étaient le taux de mortalité et la CL₅₀ (concentration létale médiane¹¹). L'influence des MWCNT-3 et de leur traitement sur la reproduction a été estimée au moyen de tests de toxicité chronique (8 jours). Le nombre de juvéniles de *C. dubia* produits au cours des trois premières générations a permis de déterminer l'EC₅₀ (concentration efficace médiane¹²) pour les MWCNT traités aux ultrasons ou à l'ozone. En ce qui concerne les effets sur la croissance, les organismes ont été exposés aux MWCNT-3 (ozone ou ultrasons) pendant 48h. La longueur totale de chaque juvénile vivant a été déterminée par observation microscopique.

Les études visant à estimer les taux d'ingestion et de défécation des MWCNT ont été conduites dans des suspensions de MWCNT-3 (100 mL, 10 mg/L). À différents temps d'exposition (15, 30, 60 min et 24h), des organismes ont été prélevés. Après 24h

¹⁰ Les organismes **benthiques** sont des animaux ou des végétaux qui vivent fixés au sol ou qui se déplacent en rasant le fond.

¹¹ concentration létale médiane (CL₅₀) : La concentration en principe actif provoquant la mort de 50% d'une population animale donnée.

¹² **Concentration efficace médiane** (EC₅₀) : La concentration en principe actif capable de donner une réponse égale à 50% de l'effet maximal observé.

d'exposition, les animaux ont été retirés de la suspension contenant les NTC puis transférés dans un milieu dépourvu de NTC afin qu'ils puissent éliminer le contenu de leur tube digestif par défécation. Le taux de remplissage du tube digestif de chaque daphnie après ingestion ou défécation a été estimé visuellement au moyen d'un microscope. Une équation de premier ordre a été utilisée pour estimer les taux d'ingestion (eq 1¹³) ou de défécation (eq 2¹³) des particules de NTC chez *C. dubia*.

Une nette influence du pré-traitement des MWCNT sur la stabilité, l'état d'agglomération des NTC et leur toxicité vis-à-vis de *C. dubia* a été observée. La toxicité aiguë (mortalité) la plus élevée a été montrée chez les organismes exposés aux MWCNT traités aux ultrasons, comme le témoigne la valeur de la CL₅₀ qui était significativement inférieure (20 mg/L) à celle observée avec les MWCNT traités à l'ozone (100 mg/L). Le même type de résultat a été observé pour les tests de reproduction ou de croissance.

En outre, après avoir ingéré et accumulé les MWCNT dans le tractus digestif, leur élimination est plus longue dans le cas des MWCNT traités aux ultrasons en comparaison avec ceux traités à l'ozone. Ces résultats peuvent être expliqués par la taille des agglomérats plus faibles dans le cas des MWCNT traités à l'ozone (en comparaison avec ceux traités aux ultrasons) et nécessitant donc une quantité d'énergie plus faible pour l'élimination des NTC du tractus digestif par les animaux.

De plus, la présence de groupes fonctionnels à la surface des NTC influence leur fixation sur les organismes.

En conclusion, cette étude confirme l'importance du traitement physico-chimique sur les interactions entre les nanomatériaux et les organismes aquatiques dans l'évaluation du devenir, du transport et des impacts écotoxicologiques des nanomatériaux [Li et Huang, 2011].

Petersen *et al.*, (2011) ont testé différentes réponses (internalisation, élimination) de daphnies (*Daphnia magna*) exposées à des MWCNT modifiés par un enrobage de surface avec le polyéthylèneimine (PEI) afin d'augmenter la stabilité des NTC en solution aqueuse et de modifier les charges de surface, ou à des MWCNT modifiés à l'acide.

Les organismes ont tout d'abord été acclimatés pendant 1h dans de l'eau seule, afin de leur permettre d'éliminer le contenu de leur tube digestif. Ensuite, concernant les expériences d'internalisation des MWCNT, les daphnies ont été exposées à des concentrations de 25 et 250 µg/L de MWCNT pendant 1, 4, 10, 24 et 48h. En ce qui concerne les expériences d'élimination, après une exposition pendant 24h aux MWCNT, les animaux ont été transférés dans de l'eau artificielle dépourvue de contaminants, et enrichie ou non en nourriture (cellules algales) pendant les mêmes temps que ceux de l'expérience d'accumulation (1, 4, 10, 24 et 48h).

À chaque temps d'exposition, les MWCNT dans les organismes ont été quantifiés par comptage¹⁴ de la radioactivité (¹⁴C) par comptage en scintillation liquide (LSC).

¹³ Equation 1 : $L = I_s (1 - e^{-k_1 t})$ pour le taux d'ingestion,

Equation 2 : $L = I_s e^{-k_2 t}$ pour le taux de défécation,

I (%) est le taux de remplissage du tube digestif au temps d'exposition t ,

I_s (%) est le taux de remplissage temporel maximal,

k_1 (min⁻¹) : la constante du taux d'ingestion,

k_2 (min⁻¹) : la constante du taux de défécation.

¹⁴ Les données ont été intégrées dans l'équation suivante :

$$C_t = \frac{C_w k_u}{k_e} (1 - e^{-k_e t})$$

avec :

C_t : concentration du composé dans l'organisme au temps t (en mg/kg de poids sec),

C_w : concentration initiale dans la phase aqueuse (en mg/L),

L'enrobage de surface des MWCNT avec le PEI ne semble pas avoir d'influence sur l'accumulation des NTC ou sur leur taux d'élimination par le tractus digestif. Malgré l'augmentation de la stabilité en solution aqueuse des MWCNT modifiés avec le PEI, des agglomérats de NTC ont été observés dans le tractus digestif des organismes, comme avec les MWCNT modifiés à l'acide. Une élimination complète des MWCNT a été observée après 48h de dépuration des daphnies nourries avec des algues alors que chez les organismes non nourris, l'élimination des MWCNT était minimale [Petersen *et al.*, 2011].

5.4 Absorption des NTC chez différentes espèces terrestres et aquatiques

Une revue de Petersen *et al.* (2011) sur l'écotoxicité des NTC chez différentes espèces terrestres, sédimentaires et aquatiques a montré qu'en dépit des effets toxiques observés, il ne semble pas y avoir d'absorption des NTC au travers des membranes épithéliales. Aussi, en l'absence d'absorption, la toxicité ne peut être attribuée qu'aux effets de ces NTC exercés à la surface des organismes.

La toxicité des suspensions aqueuses de NTC varie considérablement selon les organismes (amphibiens, daphnies, poissons) et cette variabilité peut être une conséquence des différences de l'impact des NTC au niveau des surfaces épithéliales selon les organismes.

Par exemple, chez des daphnies exposées à des fullerènes, l'accumulation des NTC à la surface des organismes peut entraver sa nage (effet indirect) [Lovern *et al.*, 2007].

Des effets écotoxicologiques minimes (e.g. sur la mortalité, la croissance et l'éclosion) ont été généralement rapportés à la suite d'expositions d'organismes du sol (*Eisenia fetida*, *Lumbriculus variegatus*) à des NTC [Petersen *et al.*, 2011].

5.5 Effets des NTC sur les communautés

La seule étude portant sur l'évaluation des effets des MWCNT à des niveaux d'organisation biologique élevés et donc présentant une haute signification écologique est celle de Velzeboer *et al.* (2011). Les auteurs ont étudié l'impact de sédiments contaminés par les MWCNT sur les communautés de macroinvertébrés benthiques.

Des sédiments originaires d'un site de référence aux Pays-Bas et présentant une diversité des communautés de la faune benthique ont été préalablement défaunés avant d'être contaminés par les MWCNT puis distribués sur le même site de collecte afin d'étudier, après 3 mois d'exposition, une éventuelle recolonisation par les organismes benthiques et les macrophytes aquatiques. Une large gamme de concentrations de MWCNT (0 ; 0,002 ; 0,02 ; 2 g/kg de sédiment poids sec) a été choisie afin de tester d'une part les effets des faibles doses correspondant à celles qui sont actuellement prédites dans l'environnement au moyen de modèles mathématiques [Gottschalk *et al.*, 2009 ; Koelmans *et al.*, 2009], d'autre part les effets de concentrations plus élevées, probablement irréalistes à l'heure actuelle d'un point de vue environnemental mais qui pourraient le devenir prochainement compte tenu de la production et de l'utilisation croissante des nanoparticules manufacturées.

Aucun impact des MWCNT sur la biodiversité n'a été révélé par l'indice de Shannon¹⁵. Bien que des effets au niveau des communautés (présence ou absence d'espèces ou de groupes d'espèces) aient été observés, ils ne peuvent être attribués uniquement aux MWCNT mais

k_u est le coefficient de transport du composé à partir de la phase aqueuse (en L/kg de masse de l'organisme/h),

k_e est la constante d'élimination du composé par les daphnies (en h⁻¹)

t est le temps (en h).

¹⁵ L'indice de Shannon est un indice permettant de mesurer la biodiversité. Il est fondé sur la notion d'entropie et permet de quantifier l'hétérogénéité de la biodiversité d'un milieu d'étude et donc d'observer une évolution au cours du temps.

également à l'influence d'autres facteurs (présence et croissance des macrophytes, distribution spatiale des réplicats).

En conclusion, cette étude montre que des effets au niveau des communautés de macroinvertébrés benthiques ne semblent probablement pas se produire en réponse à une exposition in situ à des concentrations de MWCNT pouvant correspondre à celles susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement à l'heure actuelle ou prochainement [Velzeboer et al., 2011].

Synthèse relative à l'écotoxicité des NTC

La présente synthèse sur l'écotoxicité des NTC est une mise à jour de l'état de l'art précédent [Anses, 2011]. En tout, 9 nouveaux articles (dont 3 revues) relatifs à ce sujet ont été étudiés.

Micro-organismes

Le précédent état de l'art sur les NTC avait permis de mettre en évidence que les NTC avaient un effet dose-dépendant positif ou négatif (selon la fonctionnalisation) sur la croissance d'un protozoaire, un effet cytotoxique sur les micro-organismes et un effet sur l'internalisation des nanoparticules chez un protozoaire, qui pourrait être l'une des phases initiales d'entrée des SWCNT dans la chaîne alimentaire [Anses, 2011].

Le dernier article analysé dans ce document suggère que des concentrations élevées de MWCNT dans le sol peuvent exercer une activité antimicrobienne et affecter les cycles des nutriments auxquels participent les microorganismes [Chung, 2011].

Végétaux

Le précédent état de l'art [Anses, 2011] avait mis en évidence des effets contradictoires des NTC chez les végétaux, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Dans une étude *in vitro*, la cytotoxicité éventuelle des NTC n'a pas été établie [Liu Q. *et al.*, 2009]. Dans une autre, au contraire, les NTC ont entraîné une diminution de la viabilité cellulaire, de la quantité de chlorophylle, de l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase¹⁶ et de la matière sèche en fin d'essai [Lin *et al.*, 2009]. En outre, l'étude de Liu Q. *et al.* (2009) a permis de mettre en évidence que les SWCNT ont la capacité de traverser la paroi des cellules des plantes et peuvent transporter des molécules dans les cellules végétales.

Les cinq études concernant la germination des graines et de la croissance racinaire chez des plantes supérieures exposées à des NTC ont montré des résultats contradictoires. Une étude n'a pas montré d'effet [Daohui *et al.*, 2007]. Deux autres ont montré que les NTC pénétraient à l'intérieur des graines [Khodakovskaya *et al.*, 2009 ; Wild *et al.*, 2009], que la germination était beaucoup plus rapide en leur présence [Khodakovskaya *et al.*, 2009] et qu'ils amélioreraient l'apport en eau à l'intérieur des graines [Wild *et al.*, 2009]. Au contraire, la quatrième étude a montré que des MWCNT réduisaient la germination des graines de courgette [Stampoulis *et al.*, 2009]. Enfin, la dernière étude a montré que la présence des MWCNT inhibait l'élongation des racines chez la tomate mais l'augmentait chez le concombre et l'oignon [Cañas *et al.*, 2008].

Les nouvelles études analysées viennent alimenter ces résultats contradictoires [Rico *et al.*, 2011]. Il semblerait que les interactions (sorption / liaison) entre les NTC et les particules du sol puissent expliquer ces effets [Petersen *et al.*, 2011].

Organismes aquatiques

Parmi les treize études d'écotoxicité menées sur des organismes aquatiques étudiées dans le précédent état de l'art, certaines ne montraient aucun effet toxique des NTC sur des algues ni aucun effet génotoxique sur des larves d'amphibien. D'autres ont montré des effets reprotoxiques des NTC, diminuant le taux de fertilisation chez des petits crustacés, entraînant des effets tératogènes ou des retards à l'éclosion chez les embryons du poisson zèbre ou encore une augmentation du taux de mortalité des embryons du poisson zèbre

¹⁶ La **superoxyde dismutase** est une métalloprotéine avec une activité enzymatique : la catalyse de la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Pour cette raison, cette enzyme est une partie importante du système de défense contre les radicaux libres. Elle est présente dans presque tous les organismes aérobies.

[Anses, 2011]. Ces effets ont été observés à la dose de 10 µg/mL, fréquemment utilisée (pour différents modèles et par différents auteurs) [Anses, 2011].

Trois nouveaux articles portant sur l'impact des MWCNT sur les daphnies ont été étudiés [Alloy and Roberts, 2011 ; Li et Huang, 2011 ; Petersen *et al.*, 2011]. L'accent a été mis sur l'utilisation d'agents ou de traitements physico-chimiques visant à augmenter la dispersion des MWCNT dans le milieu aquatique. Ces études ont montré un impact négatif des MWCNT sur la croissance et la reproduction [Alloy and Roberts, 2011 ; Li et Huang, 2011]. Ces effets pouvant être expliqués par une diminution de la prise de nourriture par les daphnies exposées aux MWCNT, conduisant ainsi à un déficit nutritionnel. Des effets sur la survie ont été observés dans un cas [Li et Huang, 2011] mais pas dans l'autre [Alloy and Roberts, 2011].

Une nette influence du pré-traitement des MWCNT sur la stabilité, l'état d'agglomération des NTC et leur toxicité a été mise en évidence, alors qu'aucune influence du diamètre des MWCNT sur la toxicité vis-à-vis des daphnies n'a été observée [Li et Huang, 2011].

Absorption des NTC chez différentes espèces terrestres et aquatiques

Une revue de Petersen *et al.* (2011) sur l'écotoxicité des NTC chez différentes espèces terrestres, sédimentaires et aquatiques a montré qu'en dépit des effets toxiques observés, il ne semble pas y avoir d'absorption des NTC au travers des membranes épithéliales. Aussi, en l'absence d'absorption, la toxicité ne peut être attribuée qu'aux effets exercés par ces NTC à la surface des organismes.

La toxicité des suspensions aqueuses de NTC varie considérablement selon les organismes (amphibiens, daphnies, poissons) et cette variabilité peut être une conséquence des différences de capacité d'adsorption des NTC au niveau des surfaces épithéliales selon les organismes.

Des effets écotoxicologiques minimes (e.g. sur la mortalité, la croissance et l'éclosion) ont été rapportés à la suite d'expositions d'organismes du sol (*Eisenia fetida*, *Lumbriculus variegatus*) à des NTC [Petersen *et al.*, 2011].

Effets des NTC sur les communautés de la faune benthique

L'étude de Velzeboer *et al.* (2011) sur l'impact de sédiments contaminés par les MWCNT sur les communautés de macro-invertébrés benthiques n'a montré aucun impact des MWCNT sur la biodiversité. Bien que des effets au niveau des communautés (présence ou absence d'espèces ou de groupes d'espèces) aient été observés, ils ne peuvent être attribués uniquement aux MWCNT (mais aussi à la présence et à la croissance des macrophytes, à la distribution spatiale des réplicats, *etc.*) [Velzeboer *et al.*, 2011].

En conclusion, cette étude ne montre pas d'effet au niveau des communautés de macroinvertébrés benthiques en réponse à une exposition *in situ* à des concentrations de MWCNT pouvant correspondre à celles susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement à l'heure actuelle ou prochainement, dans les conditions expérimentales mises en œuvre dans cette étude.

6 Les déterminants de la toxicité des nanotubes de carbone

Il est important de mesurer les effets des différents paramètres physico-chimiques des NTC sur différents indicateurs de toxicité. Toutefois, il est techniquement difficile de faire varier un paramètre indépendamment des autres. En effet, pour diverses raisons, les distributions de diamètres et de longueurs après traitement sont souvent corrélées. Les nanotubes de faibles diamètres sont par exemple moins résistants aux traitements ultrasons utilisés pour former des dispersions, et se coupent lors du traitement. De même les caractéristiques structurales et chimiques des NTC dépendent des conditions de synthèse, notamment la nature du catalyseur et la température de la réaction, paramètres qui fixent également le diamètre et la longueur des NTC. Les traitements oxydatifs mis en œuvre pour rendre les nanotubes hydrophiles en surface les raccourcissent par attaque préférentielle aux défauts, surtout après traitement aux ultrasons.

Nous avons retenu en priorité, dans la présente mise-à-jour, les études qui montrent clairement l'influence d'un seul paramètre et pour lesquelles les caractérisations ont été menées de manière approfondie. De telles études sont malheureusement trop rares. Il faut donc rester prudent dans les conclusions, car il reste notamment une forte incertitude sur la composition et la structure de la surface des NTC. En effet, la plupart des techniques de caractérisations mises en œuvre (XPS, Raman) ne sondent pas que la surface des NTC, mais aussi un certain nombre de couches internes, dont les caractéristiques peuvent être très différentes. Ainsi, des NTC ayant des caractéristiques moyennes similaires pourraient donner des résultats très différents sur la production de radicaux libres, un aspect déterminant vis-à-vis de leur toxicité potentielle. Les propriétés d'agglomérations dans les milieux organiques sont également cruciales pour les effets toxicologiques, et rarement étudiées en détail.

6.1 Effet de la chimie de surface des nanotubes de carbone

6.1.1 Les NTC : générateurs de radicaux libres ou antioxydants?

La capacité des nanomatériaux à stimuler la production de radicaux libres par les cellules et à générer des réactions inflammatoires est un point clé de la toxicité. En effet, c'est un problème complexe qui met en jeu divers mécanismes biologiques du système immunitaire [Shvedova, 2012]. Les radicaux libres ne sont pas seulement des indicateurs de stress, ils participent pleinement à des mécanismes de signalisation cellulaire. La présence de radicaux libres n'est donc pas nécessairement un signal de toxicité. Les nanomatériaux, et en particulier les NTC, peuvent ainsi interférer avec ces mécanismes de signalisation s'ils sont capables de catalyser des réactions radicalaires. Il est donc important de quantifier cette propriété.

Il a été noté, dans l'état de l'art précédent [Anses, 2011], la contradiction apparente des résultats sur le sujet concernant les NTC (voir aussi la revue récente par Fubini *et al.* (2011)). Il semble en effet que les NTC puissent à la fois générer des radicaux libres (directement en solution, sans cellule, *via* des sites catalytiques, ou *via* des réactions métaboliques cellulaires) et les piéger, jouant ainsi un rôle d'antioxydants. Quelques travaux récents viennent en complément de ce constat.

In vitro sans cellule

Porter *et al.* (2010), en accord avec Fenoglio (2006) et Crouzier (2010), cités dans l'état de l'art précédent [Anses, 2011], ont observé que des MWCNT (0,8 mg/mL) piégeaient des radicaux hydroxyles générés par réaction de Fenton. Les mêmes NTC ne généraient pas de

radicaux hydroxyles en présence d'eau oxygénée, malgré la présence d'impuretés de fer (0,32 %, unités non précisées).

Nagai *et al.* (2011), ont détecté par résonance paramagnétique électronique (RPE) la génération directe de radicaux hydroxyles par des MWCNT (2 mg/mL) contenant des traces de fer et de cuivre en quantité variable. La concentration de radicaux produits n'est pas corrélée avec le taux d'impuretés métalliques [Nagai, 2011].

Mühlfeld *et al.* (2011) ont étudié par RPE la génération directe de radicaux par deux types de MWCNT, courts, enchevêtrés, de diamètre 15 nm, et longs, fibreux, de diamètre 85 nm, provenant de deux fabricants différents et contenant du fer et du cuivre pour les premiers, et du fer et du cobalt pour les seconds (*cf.* tableau récapitulatif en Annexe 1). La concentration étudiée (50 µg/mL) est nettement plus faible que dans les études précédentes. Deux molécules pièges à spin (*spin trap*) ont été utilisées : le Tempone-H (1 mM) et le DMPO (50 mM), afin de distinguer la nature des radicaux formés. Les auteurs de cette étude ont ainsi observé que seul les nanotubes enchevêtrés généraient des radicaux piégés par du Tempone-H, tel le superoxyde. Aucun des échantillons n'a produit de radicaux hydroxyles [Mühlfeld, 2011].

In vitro avec cellules

Les études décrites ci-dessous témoignent d'un effet positif des NTC sur la production de radicaux libres par les cellules. On peut au moins en déduire que l'effet antioxydant des NTC n'est pas suffisant pour piéger tous les radicaux émis. Pour établir un lien direct avec la chimie de surface, il aurait été utile de trouver dans ces études une comparaison entre les effets *in vitro* sans cellule et avec cellules, et une comparaison entre NTC bruts et purifiés. En effet, la production de radicaux libres par des cellules soumises à un stress dû à la présence de NTC en contact avec la membrane cellulaire, ou dans le cytoplasme, est une réaction métabolique normale, qui peut survenir en l'absence totale de réactivité de surface des NTC. C'est le cas par exemple avec des NTC produits par arc électrique, qui contiennent très peu de défauts de structure. Tout au plus peuvent-ils jouer un rôle d'antioxydant en réagissant avec les radicaux émis par les cellules.

Ainsi, Garza *et al.* (2008) ont observé une production significative d'espèces réactives de l'oxygène (ROS: *Reactive oxygen species*) chez une lignée de cellules épithéliales (A549) en contact avec des MWCNT produits par arc électrique. La même étude montre que des MWCNT catalytiques contenant du nickel génèrent cinq fois plus de ROS que les NTC produits par arc-électriques. Les deux types de NTC (5 mg/mL) provoquent une mortalité de 7-8 % des cellules à 48 h [Garza *et al.*, 2008]. Ainsi, la production totale de ROS et la mortalité cellulaire due à l'exposition aux NTC ne sont pas directement corrélées.

He *et al.* (2011) ont observé par marqueur fluorescent (DHE) la production de ROS dans des cellules pulmonaires humaines (BEAS-2B, WI38-VA13, et A549) exposées 16 h à des MWCNT longs (10 µm) de petits diamètres (8,7 nm), à 20 µg/mL, contenant probablement des traces de Co et de Mg [He, 2011].

Guo *et al.* (2012) ont mis en évidence la production de radicaux peroxydes par test fluorescent dans des cellules pulmonaires humaines A549 avec des NTC courts (<2 microns) [Guo 2012].

Thurnherr *et al.* (2011) ont détecté des radicaux libres par test DCF dans des cellules A549 exposées à des MWCNT de petits diamètres contenant des impuretés de cobalt et de magnésium [Thurnherr, 2011].

Dans ces trois études, la capacité des NTC à générer des radicaux sans cellule n'a pas été testée. On ne peut donc rien conclure sur l'effet de la chimie de surface.

Enfin, Palomäki *et al.* (2011) ont mis en évidence l'effet inflammatoire de NTC longs et rigides sur des macrophages primaires humains, effet lié à la production de radicaux libres par les cellules [Palomäki, 2011]. En effet, le taux de cytokines IL-1β diminue lorsqu'un antioxydant est ajouté au milieu de culture. Les auteurs ont ici vérifié que les nanotubes

utilisés ne produisent pas de radicaux hydroxyles sans cellule. Les radicaux hydroxyles ont été mesurés par dosage HPLC après réaction avec l'acide benzoïque.

In vivo

Un effet de stress oxydant et de réduction du potentiel antioxydant du sérum de rats après injection IT de NTC ont été rapportés chez des rats [Reddy, 2011]. La nature des catalyseurs n'est malheureusement pas indiquée.

Patlolla *et al.* (2011) ont montré que des MWCNT, recuits à 2 000°C et fonctionnalisés par oxydation, provoquent la production de radicaux libres *in vivo* chez des souris males Swiss-Webster (détection par fluorescence avec DCFH-DA) [Patlolla, 2011]. De faibles traces de fer peuvent persister et catalyser la production de radicaux.

L'article n'apporte aucune précision sur la teneur en fer des NTC. Même si la plus grande partie des résidus à base de fer du catalyseur est a priori éliminée à 2 000°C, de faibles traces de fer peuvent subsister et catalyser la production de radicaux. De plus, aucun « blanc » (soit l'extrait de milieu qui a été mis en contact avec les NTC, soit les cellules sans NTC) n'a été fait.

Ex vivo

Hsieh *et al.* (2012) ont étudié la diminution de la capacité antioxydante de sérum humain exposé à différents types de NTC [Hsieh, 2012]. Les auteurs définissent un paramètre de dommage oxydatif, *biological oxidative damage* (BOD), rapporté à la masse, qui augmente de manière non-linéaire avec la surface spécifique des nanomatériaux, le BOD spécifique (sBOD = BOD / surface spécifique) a ensuite été analysé en fonction du diamètre et des impuretés métalliques. Les auteurs constatent ainsi un effet marqué avec les NTC contenant des concentrations importantes en cobalt, et présentant de petits diamètres.

6.1.2 Fonctionnalisation

Kennedy *et al.* (2009) ont étudié l'effet de la fonctionnalisation sur la toxicité de MWCNT sur *C. dubia*. Notons qu'avant l'exposition les MWCNT sont dispersés par de la matière organique. Le greffage de chaînes alkyles C8 avec ou sans amines terminales augmente la toxicité alors que les groupes oxygénés la réduisent. Ces effets pourraient être dus à des modifications de l'état d'agglomération des NTC et en conséquence à des modifications des interactions avec les surfaces épithéliales [Kennedy *et al.*, 2009]. Remarquons toutefois que les MWCNT bruts contiennent du cobalt, alors que les MWCNT-OH contiennent du nickel [SI Kennedy, 2008], ce qui indique qu'ils ne proviennent pas du même lot. Il est donc difficile d'isoler les effets d'un seul paramètre.

Petersen *et al.* (2010) ont étudié les effets d'une modification de l'énergie de surface de MWCNT sur l'accumulation et l'élimination par des oligochètes (*Eisenia foetida* et *Lumbriculus variegatus*). Ils montrent notamment l'absence de corrélation entre coefficient de partition octanol-eau et bioaccumulation, contrairement à ce qui est observé sur des molécules organiques hydrophobes. Une absence d'accumulation des MWCNT dans les organismes et une capacité d'évacuation indépendante des fonctions de surface ont été observées [Petersen, 2010].

Les mêmes auteurs ont obtenu des résultats similaires avec des nanotubes purifiés et greffés par du polyéthylénimine sur des vers de terre (*Eisenia fetida*) [Petersen, 2011a] et des daphnies (*Daphnia magna*) [Petersen, 2011b]. Dans toute cette série d'études, la bioaccumulation a été mesurée *via* la radioactivité des nanotubes enrichis en ¹⁴C lors de la synthèse, ce qui permet d'éviter certains artefacts. L'exposition est ainsi quantifiée.

Li et Huang (2011) ont étudié l'effet du traitement physico-chimique des MWCNT dans la réponse de la *Ceriodaphnia dubia*. Les auteurs utilisent des MWCNT de différents diamètres externes mais produits par la méthode de CVD en lit fluidisé et purifiés par traitement à l'acide nitrique (+ température). Ils considèrent des MWCNT avec 3 diamètres moyens différents (14,1 ; 34,6 et 59,2 nm). Ils les dispersent après ozonisation et ultra-sons, ou

ultrasons, ou traitement mécanique. La taille des agglomérats est plus petite et la « charge de surface » (potentiel zéta) négative pour les MWCNT traités à l'ozone. Le traitement à l'ozone est connu pour induire la présence de groupements contenant de l'oxygène en surface des nanotubes mais les auteurs n'ont pas réalisé une étude XPS pour le quantifier. Les auteurs relient les modifications de surface (cas du traitement à l'ozone) avec la capacité de la *C. dubia* à éliminer les MWCNT (impossible pour des agglomérats de quelques dizaines de micromètres) et avec les interactions entre les nanotubes et les tissus (plus faibles pour des nanotubes chargés négativement, les tissus étant eux-mêmes chargés négativement). Cela expliquerait les effets toxicologiques moindres des nanotubes traités à l'ozone. A noter aussi que pour déterminer la taille des agglomérats en solution, les auteurs utilisent de manière complémentaire la diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*, DLS) pour des diamètres inférieurs à 3 micromètres et la microscopie optique au-delà.

Wang *et al.* (2011) ont montré que des nanotubes oxydés hydrophiles n'induisent pas de réponse profibrogène *in vitro* et *in vivo*, contrairement aux nanotubes bruts hydrophobes [Wang, 2011].

Enfin, Zhang *et al.* (2012) ont étudié l'effet de la fonctionnalisation de MWCNT avec des fonctions hydrophiles (oxydation et greffage PEG) sur la cytotoxicité vis-à-vis de macrophages murins RAW 264.7. Ils observent une diminution de la viabilité cellulaire (WST¹⁷ et LDH) moindre avec la fonctionnalisation par rapport à l'absence de fonctionnalisation. Toutefois, même les nanotubes PEG restent cytotoxiques. Les MWCNT-COOH, internalisés en plus grande quantité, engendrent des réactions inflammatoires plus fortes que les MWCNT bruts et PEG [Zhang, 2012].

Toutefois, d'autres études indiquent exactement le contraire [Bellucci, 2006 ; Bottini, 2006 ; Landois, 2008].

6.2 Effet de la taille des nanotubes de carbone

6.2.1 Longueur

6.2.1.1 Le problème de la mesure par microscopie ou diffusion dynamique de la lumière

Il est difficile de mesurer précisément et sur un nombre suffisant de NTC une distribution de longueur par comptage direct à partir d'images MET, MEB ou AFM. À titre indicatif, 1 mL de solution à 10 µg de MWCNT de diamètre 20 nm et de longueur 1 µm ne contient pas moins de 16 milliards de NTC.

Dans la plupart des études, la statistique de distribution en longueur est réalisée sur un échantillon qui ne dépasse pas quelques centaines de NTC. La mise en place de méthodes de comptage automatiques ou semi-automatiques serait nécessaire pour augmenter la précision [Vippola, 2009], mais ces méthodes sont rarement employées avec des NTC. La préparation des échantillons reste délicate et n'est pas sans biais. Par exemple, lorsqu'une goutte est déposée sur une surface puis séchée, les effets d'agglomération sur les bords de la goutte peuvent biaiser la distribution des NTC.

Pour augmenter la taille de l'échantillon sur lequel est réalisée l'étude statistique, la distribution de longueur peut être mesurée par DLS (diffusion dynamique de la lumière). Toutefois, l'utilisation de cette technique pour des colloïdes de forme complexe comme des NTC est difficile à réaliser, en particulier lorsque la distribution en taille est très large, comme c'est souvent le cas. L'analyse effectuée sur des appareils commerciaux mis au point pour

¹⁷ Le test **WST** est un test de cytotoxicité utilisant le (2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium).

des particules sphériques dont la distribution en taille est relativement serrée n'est pas optimale avec des NTC. Plus les NTC sont longs et plus les effets de gêne stérique sont probables, ce qui a pour effet de ralentir anormalement leur mouvement brownien. Ainsi, il devient impossible de calculer la longueur à partir du signal DLS. Les concentrations en NTC, dans la plupart des travaux, sont trop grandes pour assurer une rotation libre des NTC.

6.2.1.2 Effets de la longueur sur la toxicité

Comme toutes les nanoparticules à facteur de forme (rapport longueur sur diamètre) élevé, les NTC droits dont la longueur excède la dizaine de micromètres sont difficilement éliminés par l'organisme. De plus, ils semblent obéir au paradigme de la pathogénicité pulmonaire des fibres longues [Donaldson, 2010]. La réponse inflammatoire de macrophages primaires humains exposés à des NTC longs est de même intensité que pour des fibres d'amiante [Palomäki, 2011].

Kim *et al.* (2012) ont étudié l'effet de la longueur sur la génotoxicité de MWNTs. Les NTC longs sont plus toxiques que les courts, mais la chimie de surface est différente entre les longs et les courts, ces derniers étant obtenus par attaque acide des longs [Kim, 2012].

6.2.2 Diamètre

Nagai *et al.* (2011) et Fenoglio *et al.* (2012) aboutissent à la même conclusion d'une toxicité pulmonaire plus grande des NTC de petits diamètres (*in vitro* et *in vivo* chez des rats) [Nagai, 2011 ; Fenoglio, 2012]. On constate néanmoins que dans les deux études, le taux d'impuretés (fer notamment) est supérieur pour les NTC de petits diamètres. À taux d'impuretés fixé, il semble probable qu'une grande surface spécifique puisse favoriser la génération ou la capture de radicaux libres *via* des réactions catalytiques à la surface des NTC, ou induites par les ions métalliques dissous. Il faut noter aussi que les NTC « fins » de Nagai (50 nm) sont de diamètre voisin des « épais » de Fenoglio (70 nm), les « épais » de Nagai étant à 150 nm et les « fins » de Fenoglio à 9,4 nm de diamètre.

Au contraire, Li et Huang (2011) ont observé une toxicité indépendante du diamètre des NTC (3 diamètres moyens différents (14,1 ; 34,6 et 59,2 nm)) dans leur étude sur l'effet du traitement physico-chimique des MWCNT dans la réponse de la *Ceriodaphnia dubia* [Li et Huang, 2011]. Aucune information sur la longueur des MWCNT n'a été fournie dans cette étude.

6.3 Effet de l'état de dispersion

Mühlfeld *et al.* (2011) ont étudié les effets de NTC longs et séparés, ou courts et enchevêtrés sur la réponse inflammatoire à 24 h et les lésions pulmonaires à 28 jours sur des souris femelles C57BL/6. Seuls les NTC courts (agglomérés) engendrent une fibrose septale, associée à une forte augmentation des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) dans le LBA. Les auteurs notent toutefois le possible rôle de la physico-chimie de surface dans ces résultats, car seuls les NTC courts produisent des radicaux peroxydes [Mühlfeld, 2011].

Li et Huang ont observé *a posteriori* des effets de l'agglomération sur la toxicité de MWCNT sur des organismes aquatiques *Ceriodaphnia dubia*. Par différents traitements (ozone et ultrasons), les auteurs ont montré que les NTC agglomérés dans l'eau s'avèrent plus toxiques que les NTC bruts, ou les NTC traités à l'ozone et dispersés. La toxicité semble indépendante du diamètre des NTC mais liée à une obstruction du tractus gastrique des daphnies. Le traitement à l'ozone introduit des fonctions de surface qui permettent la dispersion des NTC dans l'eau. Les NTC traités aux ultrasons se trouvent raccourcis mais toujours hydrophobes, ce qui entraîne une agglomération [Li et Huang, 2011]. Les caractérisations sont toutefois assez peu détaillées.

En revanche, en étudiant l'effet du pH sur la toxicité des NTC vis-à-vis des daphnies, Alloy et Roberts (2011), bien qu'ayant observé une modification de la taille des agglomérats en

fonction du pH, n'ont observé aucune influence de ce paramètre sur la toxicité, ceci pouvant être expliqué par le mode d'action et la large gamme de taille des particules dont peuvent se nourrir les daphnies [Alloy et Roberts ; 2011].

Une difficulté majeure qui apparaît lorsque l'on souhaite comparer différentes études de toxicité provient des problèmes liés à la dispersion des NTC hydrophobes dans les milieux de culture ou les fluides biologiques. Les surfactants utilisés pour des applications composites sont en effet cytotoxiques (eg, le sodium dodécyl sulfate, SDS). Des solutions existent néanmoins pour disperser les NTC dans des milieux biocompatibles [Piret, 2010 ; Vippola, 2009 ; Wang, 2010].

Wang *et al.* ont (2011) montré que des NTC dispersés induisent une réponse profibrogène *in vitro* et *in vivo* plus marquée que des NTC non dispersés [Wang, 2011].

Vankoningsloo *et al.* (2012) ont montré que des agglomérats de NTC déclenchent une réaction inflammatoire plus élevée qu'avec les NTC individualisés par des surfactants biocompatibles, lors d'une étude réalisée *in vitro* sur des kératinocytes p16(INK4A) [Vankoningsloo, 2012].

Synthèse sur les déterminants de la toxicité

Il est important de mesurer les effets des différents paramètres physico-chimiques des NTC sur les différents indicateurs de toxicité. Pour cela, nous avons retenu en priorité les études qui montrent clairement l'influence d'un seul paramètre, dans la mesure du possible, et pour lesquelles les caractérisations physico-chimiques ont été menées de manière approfondie. De telles études sont malheureusement trop rares. Il faut donc rester prudent dans les conclusions présentées ci-après, car il reste de nombreuses incertitudes (notamment sur la composition et la structure de la surface des NTC).

Chimie de surface

Les NTC peuvent à la fois générer des radicaux libres, catalyser des réactions radicalaires avec ou sans cellules, probablement *via* des ions métalliques provenant des catalyseurs et *via* des défauts structuraux, et se comporter également comme des antioxydants en réagissant avec les radicaux. Remarquons qu'il est connu en science des matériaux que le graphite peut réagir avec des radicaux, cette propriété apparaît donc intrinsèque. Toutefois, l'adsorption de protéines à la surface des NTC (opsonisation) devrait minimiser l'effet de réactions catalytiques avec la surface des NTC *in vivo* et *in vitro* avec sérum complet. De nombreux travaux ont néanmoins observé une augmentation du taux de radicaux libres dans des cellules exposées à des NTC, *in vivo* et *in vitro*. Cette production ne semble pas liée directement à la chimie de surface des NTC. Le rôle antioxydant potentiel des NTC ne semble pas être suffisant pour bloquer les réactions inflammatoires observées *in vivo* et *in vitro*. En revanche, l'interaction avec des mécanismes de signalisation cellulaire mettant en jeu des radicaux libres et des antioxydants semble probable.

Ainsi, des études montrent une déplétion en antioxydants due à l'exposition aux NTC, mais le lien avec la chimie de surface n'est pas établi. La complexité du problème est telle que des études exhaustives devront être menées avant d'aboutir à une compréhension complète des mécanismes.

Fonctionnalisation

Il a été mentionné dans l'état de l'art précédent que des nanotubes rendus hydrophiles par fonctionnalisation sont moins toxiques et plus facilement éliminés que des nanotubes hydrophobes. Des études récentes viennent confirmer ce constat [Kennedy, 2009 ; Petersen, 2010, 2011a et 2011b ; Li et Huang, 2011 ; Wang, 2011 ; Zhang, 2012], alors que d'autres, au contraire, montrent exactement l'inverse [Bellucci, 2006 ; Bottini, 2006 ; Landois, 2008].

Taille

La taille des NTC (longueur et diamètre) est un paramètre déterminant de leur toxicité.

Les NTC longs sont plus toxiques que les courts, mais la chimie de surface est différente entre les longs et les courts, ces derniers étant obtenus par attaque acide des longs [Kim, 2012].

Selon Nagai et Fenoglio, la toxicité pulmonaire des NTC est plus grande pour les NTC de petits diamètres (*in vitro* et *in vivo* chez des rats) [Nagai, 2011 ; Fenoglio, 2012]. Toutefois, ces résultats ne sont pas confirmés par Li et Huang qui ont observé une toxicité indépendante du diamètre des NTC [Li et Huang, 2011].

État de dispersion

L'état de dispersion (NTC agglomérés ou individualisés) joue un rôle important dans leur disponibilité et leur toxicité, certaines études montrant un effet plus toxique des agglomérats

[Li et Huang, 2011 ; Vankoningsloo, 2012], d'autres pas d'effet de l'état de dispersion [Alloy et Roberts ; 2011].

7 Conclusions

La revue de la littérature 2011-2012 a permis de rappeler que certains nanotubes de carbone multi-paroi (MWCNT, *Multi-walled carbon nanotubes*) peuvent provoquer *in vitro* des effets génotoxiques (cassures d'ADN et de chromosomes), des aberrations chromosomiques (échanges de chromatides sœurs, aneuploïdie), des atteintes cellulaires telles que des effets délétères sur la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore un processus inflammatoire.

Les résultats des tests *in vitro* sont compatibles avec les résultats des études *in vivo* qui ont elles aussi montré des effets génotoxiques et inflammatoires notamment. Si le danger n'est pas avéré pour toutes les voies d'exposition et pour tous les nanotubes de carbone (NTC) étudiés, il n'en demeure pas moins que des effets tératogènes, des effets pathologiques respiratoires (tels que la formation de granulomes, la fibrose) et des effets cancérogènes (mésothéliomes) ont été démontrés. Ces effets sont dépendants de la voie d'exposition, de la dose et du délai après l'exposition. La détection et / ou la persistance des effets après la cessation de l'exposition a été montrée.

Si l'on commence à mieux appréhender les dangers liés à certains NTC, on n'en connaît pas encore bien tous les mécanismes. De nouvelles études fondamentales sont donc nécessaires (par exemple pour mieux comprendre les mécanismes de production d'espèces actives dérivées de l'oxygène ou de génotoxicité des NTC).

Un pré-requis pour comprendre ces mécanismes est une meilleure caractérisation physico-chimique des NTC, avant exposition mais aussi dans le milieu d'exposition. Dans la plupart des études sur la toxicité ou l'écotoxicité des NTC, les particules mises en œuvre sont peu caractérisées d'un point de vue physico-chimique. Or, l'évaluation des risques éventuels liés à la présence des NTC dans l'environnement est étroitement associée à la caractérisation physico-chimique systématique de chacun des types de NTC étudiés. Les NTC présentent des structures et des morphologies différentes (nombre de parois, diamètre, défauts de structure, nanoparticules de catalyseurs résiduels, etc.) et une chimie de surface potentiellement très différente, y compris pour un même type de NTC, qu'il soit brut, dispersé ou co-exposé avec un contaminant de référence.

Les effets des NTC *in vitro*, *in vivo* et sur l'environnement dépendent de leur morphologie, de leur chimie de surface (fonctionnalisation de surface, etc.), de la présence d'impuretés (traces de métaux), de la dispersion, de la désagglomération et des traitements post-purification qui peuvent altérer certaines propriétés (longueur, pureté, degré d'agglomération et structure par exemple).

L'un des problèmes majeurs rencontrés pour l'interprétation des travaux publiés découle de la connaissance insuffisante des caractéristiques des échantillons étudiés et / ou de leur grande diversité. De même, la comparaison des résultats entre les différentes études n'est pas évidente dans la mesure où, le plus souvent, plusieurs paramètres physico-chimiques des NTC étudiés varient en même temps. C'est pourquoi certains résultats peuvent paraître contradictoires. La caractérisation physico-chimique des NTC étudiés est donc un enjeu essentiel.

Les effets à long terme des NTC mériteraient également d'être étudiés. Des modèles sur cellules en culture pourraient être développés pour être utilisés dans des études toxicologiques à grande échelle afin de déterminer les modifications des voies de régulation qui contrôlent l'homéostasie cellulaire.

En outre, des connaissances sur la biodisponibilité des NTC après administration pulmonaire sont nécessaires, le passage systémique ayant été suggéré pour cette voie d'exposition.

Enfin, la biopersistance des NTC dans l'organisme (essentiellement poumons et foie) constitue une source d'inquiétude quant à la dangerosité à long terme de ces matériaux et mériterait également d'être étudiée de manière approfondie.

En ce qui concerne l'écotoxicité des NTC, la revue de la littérature 2011-2012 a permis de mettre en évidence que les MWCNT dans le sol pouvaient exercer une activité antimicrobienne et affecter les cycles des nutriments dans lesquels sont impliqués les microorganismes. Elle a également permis de confirmer que les NTC avaient des effets contradictoires sur les végétaux (les interactions entre les NTC et les particules du sol étant probablement à l'origine de ces contradictions), qu'ils avaient des effets négatifs sur la croissance et la reproduction des daphnies et qu'il ne semblait pas y avoir d'absorption des NTC au travers des membranes épithéliales chez différentes espèces terrestres et aquatiques. De plus, les études d'écotoxicité montrent globalement que les NTC peuvent être ingérés par les organismes ; à ce titre, l'évaluation du risque environnemental lié à leur dissémination et à leur transport dans l'environnement nécessite d'être renforcée. Par ailleurs, à l'heure actuelle, une seule étude traite de l'impact des NTC à des niveaux d'organisation biologique complexes (communautés de macroinvertébrés benthiques). Cette étude présente une pertinence écologique élevée, mais elle ne montre pas d'effet en réponse à une exposition *in situ* à des MWCNT.

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

Les connaissances dans ce domaine demandent à être enrichies et approfondies afin de mieux prévoir les conséquences éventuelles des NTC sur l'environnement à court ou à long termes. En particulier, d'autres études à des niveaux d'organisation biologique élevés sont nécessaires.

Enfin, l'exposition aux NTC peut avoir lieu à tout moment du cycle de vie des produits en contenant (pendant leur fabrication, leur transport, leur utilisation ou leur élimination). Le plus souvent, ils sont incorporés dans des matrices et non sous forme libre à l'intérieur des produits de consommation. L'éventualité que des NTC puissent être libérés au fur et à mesure de l'usure des produits ou lors de leur élimination doit être envisagée. À l'heure actuelle, les études sur l'exposition des travailleurs et de la population aux NTC font cruellement défaut. Étant donné que des produits contenant des NTC sont d'ores et déjà à la portée d'un large public, des études dans ce domaine sont indispensables.

Il apparaît nécessaire, en amont du développement de la production de nanotubes de carbone, de la multiplication de leurs usages et de leur mise sur le marché, d'évaluer les expositions éventuelles de la population en conditions réelles et d'avoir une bonne connaissance du cycle de vie de ces matériaux. Cela est un pré-requis pour une l'évaluation raisonnée des risques professionnels et environnementaux.

8 Références bibliographiques

- Afsset, (Juillet 2006). Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. Synthèse. pp 1-6.
- Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), (2010). Expertise des études de danger relatives au GRAPHISTRENGTH C100 réalisées dans le cadre du programme Génésis.
- Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), (2011). Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone - Etat de l'art.
- Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), (2012). Expertise de l'évaluation des risques liés au GRAPHISTRENGTH C100 réalisée dans le cadre du programme Génésis - Rapport d'expertise n°2.
- Bellucci S, Balasubramanian C, Bergamaschi A, et al., (2006). *Biomedical Applications of Carbon Nanotubes and the related Cellular Toxicity*. NSTI-Nanotech 2006, www.nsti.org, ISBN 0-9767985-7-3 Vol. 2, 2006.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, et al., (2006). *Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis*. Toxicology letters, 2006, vol. 160, n°2, pp. 121-126.
- Catalán J., Järventaus, H. Vippola K., et al. (2011). *Induction of chromosomal aberrations by carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles in human lymphocytes in vitro*. Nanotoxicology.
- Cavallo D. et al. (2011). *Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial cells*. J. Appl. Toxicology.
- Chung, Son, Yoon. et al. (2011). *The effect of multi-walled carbon nanotubes on soil microbial activity*. Ecotoxicology and Environmental Safety 74 (2011) 569–575.
- Corradi S., et al. (2011). *Influence of serum on in situ proliferation and genotoxicity in A549 human lung cells exposed to nanomaterials*. Mutation Research 745 (2012) 21– 27.
- Crouzier D., Follot S., Gentilhomme E., et al. (2010). *Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung*. Toxicology, 272, (1-3), (2010), 39-45.
- Di Giorgio ML et al. (2011). *Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy*. Mutation Research 722 (2011) 20–31.
- 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, 2010. 7.
- Fenoglio I., Tomatis M., Lison D., et al. (2006). *Reactivity of carbon nanotubes : free radical generation or scavenging activity ?* Free Radic Biol Med, 40(7): 1227–1233.
- Fenoglio I., et al. (2012). *Thickness of Multiwalled Carbon Nanotubes Affects Their Lung Toxicity*. Chemical Research in Toxicology, 2012. 25(1): p. 74-82.
- Fubini, B., et al. (2011). *Effect of chemical composition and state of the surface on the toxic response to high aspect ratio nanomaterials*. Nanomedicine, 2011. 6(5): p. 899-920.
- Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, et al. (2012). *Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice*. J Toxicol Sci. 37:81-9.
- Garza, Soto, Murr (2008). *Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials*. International Journal of Nanomedicine 2008:3(1) 83–94.
- Ghosha M. et al. (2011). *Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): Induction of DNA damage in plant and mammalian cells*. Journal of Hazardous Materials 197 (2011) 327– 336.
- Guo, F., et al. (2012). *Nitrative DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube via endocytosis in human lung epithelial cells*. Toxicology and Applied Pharmacology, (0).
- Haniu H. et al. (2011). *Elucidation mechanism of different biological responses to multi-walled carbon nanotubes using four cell lines*. International Journal of Nanomedicine.

- He, X., et al. (2011). *Multiwalled Carbon Nanotubes Induce a Fibrogenic Response by Stimulating Reactive Oxygen Species Production, Activating NF- κ B Signaling, and Promoting Fibroblast-to-Myofibroblast Transformation*. *Chemical Research in Toxicology*, 2011. 24(12): p. 2237-2248.
- Hsieh, S.-F., et al. (2012). *Biological oxidative damage by carbon nanotubes: Fingerprint or footprint?* *Nanotoxicology*, 2012. 6(1): p. 61-76.
- 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*, 2006. 165(1): p. 88-100.
- Kang, J.W.;Lee, J.H.;Lee, H.J.; et al. (2005). *Long fine single-wall carbon nanotube growth by Nano-spin-threading: model schematics and simulations*. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, Volume 25, Issue 4, Pages 347-355.
- Kim, Sung, Song, et al. (2012). *Persistent DNA Damage Measured by Comet Assay of Sprague Dawley Rat Lung Cells after Five Days of Inhalation Exposure and 1 Month Post-Exposure to Dispersed Multi-Wall Carbon Nanotubes (MWCNTs) Generated by New MWCNT Aerosol Generation System*. *Toxicological Sciences* 128(2), 439–448 (2012).
- Lacerda L, Russier J, Pastorin G, et al. (2012). *Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes*. *Biomaterials* 33:3334-43.
- Landois P. (2008). *Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone*. Thèse de doctorat en Sciences et Génie des Matériaux. Université de Toulouse, Sciences de la Matière.
- Li, Z., et al. (2011). *Metal catalyst residues in carbon nanotubes decrease the thermal stability of carbon nanotube/silicone composites*. *Carbon*, 2011. 49(13): p. 4138-4148.
- Lin C, Fugetsu B, Su Y, Watari F. (2009). *Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells*. *J. Hazard Mater.* 170(2-3): 578-83.
- Madl A. K. et al. (2011). *Aerosol Science and Technology. Aerosolization System for Experimental Inhalation Studies of Carbon-Based Nanomaterials*.
- Meike van der Zande et al. (2011). *Carbon Nanotubes in Animal Models: A Systematic Review on Toxic Potential*. *Tissue Engineering : Part B Volume 17, Number 1, 2011*.
- Mercer RR, Scabilloni J, Wang L, et al. (2008). *Alteration of deposition pattern and pulmonary response as a result of improved dispersion of aspirated single-walled carbon nanotubes in a mouse model*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, 1, L87-97.
- Mercer, Hubbs, Scabilloni, et al. (2011). *Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes*. *Particle and Fibre Toxicology* 2011, 8:21.
- Morimoto, Hirohashi, Ogami, et al. (2011). *Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intratracheal instillation*. *Nanotoxicology*, 2011; Early Online, 1–15.
- Mühlfeld, Poland, Duffin, et al. (2011). *Differential effects of long and short carbon nanotubes on the gas-exchange region of the mouse lung*. *Nanotoxicology*, 2011; Early Online, 1–13.
- 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*, 2011. 108(49): p. E1330-E1338.
- Pacurari M. et al. (2011). *Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in the mouse lung: Association with lung pathology*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 255 (2011) 18–31.
- Palomaki, J., et al. (2011). *Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar Mechanism*. *Acs Nano*, 2011. 5(9): p. 6861-6870.
- Patlolla, A., A. Berry, P. Tchounwou (2011). *Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss-Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011. 358(1): p. 189-199.
- Petersen E.J., Pinto R.A., Landrum P.F., et al. (2009). *Influence of carbon nanotubes on pyrene bioaccumulation from contaminated soils by earth- worms*. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4181–4187.
- Petersen, E.J., Q. Huang, W.J. Weber, et al. (2010). *Relevance of octanol–water distribution measurements to the potential ecological uptake of multi-walled carbon nanotubes*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010. 29(5): p. 1106-1112.

- Petersen, E.J., et al. (2011a). *Influence of Polyethyleneimine Graftings of Multi-Walled Carbon Nanotubes on their Accumulation and Elimination by and Toxicity to Daphnia magna*. Environmental Science & Technology, 2011. 45(3): p. 1133-1138.
- Petersen, E.J., et al. (2011b). *Effects of Polyethyleneimine-Mediated Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Earthworm Bioaccumulation and Sorption by Soils*. Environmental Science & Technology, 2011. 45(8): p. 3718-3724.
- Piret, J.P., et al. (2010). *Dispersion of multi-walled carbon nanotubes in biocompatible dispersants*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. 12(1): p. 75-82.
- Ponti J., et al. (2012). *Morphological transformation induced by multiwall carbon nanotubes on Balb/3T3 cell model as an in vitro end point of carcinogenic potential*. Nanotoxicology; Early Online, 1–13.
- Reddy, A.R.N., et al. (2011). *Evaluation of oxidative stress and anti-oxidant status in rat serum following exposure of carbon nanotubes*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2011. 59(2): p. 251-257.
- Rico C. M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., et al. (2011). *Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain*. J. Agric. Food Chem. 2011, 59 (8), 3485–3498.
- Ronzani C., et al. (2012). *Lung deposition and toxicological responses evoked by multi-walled carbon nanotubes dispersed in a synthetic lung surfactant in the mouse*. Arch Toxicol (2012) 86:137–149.
- Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, et al. (2008). *Inhalation vs. aspiration of singlewalled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295, 4, L552-565.
- Thurnherr, T., et al. (2011). *A comparison of acute and long-term effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human lung and immune cells in vitro*. Toxicology Letters, 2011. 200(3): p. 176-186.
- Van der Zande, et al. (2011). *Carbon Nanotubes in Animal Models: A Systematic Review on Toxic Potential*. Tissue Engineering: Part B. Volume 17, Number 1, 2011.
- Vankoningsloo, S., et al. (2012). *Pro-inflammatory effects of different MWCNTs dispersions in p16(INK4A)- deficient telomerase-expressing human keratinocytes but not in human SV-40 immortalized sebocytes*. Nanotoxicology, 2012. 6(1): p. 77-93.
- Vippola, M., et al. (2009). *Preparation of nanoparticle dispersions for in-vitro toxicity testing*. Human & Experimental Toxicology. 28(6-7): p. 377-385.
- 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, 2010. 4(12): p. 7241-7252.
- Wang X., et al. (2011). *Dispersal State of Multiwalled Carbon Nanotubes Elicits Profibrogenic Cellular Responses That Correlate with Fibrogenesis Biomarkers and Fibrosis in the Murine Lung*. Acs Nano, 2011. 5(12): p. 9772-9787.
- Zheng L. X., O'Connell M. J., Doorn S. K., et al. (2004). *Ultralong single-wall carbon nanotubes*. Nature Materials 3, 673–676 (2004).
- 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*. Journal of Hazardous Materials 219– 220 (2012) 203– 212.
- Zhao X, Liu R. (2012). *Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels*. Environment International. 40:244-55.

Annexe 1 : Tableau d'analyse des articles

Auteur	Année	Type d'étude	Cible étudiée	Type NTC	Méthode de synthèse	Diamètres-Longueur-forme	Caractérisations structurales	Impuretés	Concentrations étudiées et durée du traitement	Voie d'exposition	Effets observés ou paramètres étudiés
Alloy	2011	<i>in vivo</i>	<i>C. dubia</i> , <i>D. magna</i>	MWCNT		Diamètre externe: 20-30nm selon fournisseur	SEM et Dynamic Light Scattering pour taille agrégats. Seul SEM retenu car taille > longueur d'onde de la lumière	5% (sans plus de précisions)	concentrations (1, 2, 4, 10mg/L:pH:7; 1, 2, 4, 10 mg/L:pH:6 et 8, survie, croissance (96h), reproduction (<i>C. dubia</i> : 7j, <i>D. magna</i> : 21j)	Bioessais, eau	Impact sur la croissance et la reproduction; pas d'effet du pH sur ces paramètres
Catalán	2011	<i>in vitro</i>	Lymphocytes humains de donneurs sains	MWCNT (SES Research Houston)			<u>Short MWCNT</u> Morphologie : Diamètre externe 10 – 30 nm / Longueur de 1 à 2 micromètres Composition : > 95% CNTs, Surface Spécifique : 60 m ² /g (measured by the adsorption method, using BET analysis).	< 2% amorphous Carbon, < 0.2% ash, traces de Ni	0, 6,25, 50, 100, 150, 300 µg/mL ; 24, 48, 72 heures.	<i>in vitro</i>	Induction d'aberrations chromosomiques à 300µg/mL, 48h. Index mitotique non modifié.
Cavallo	2012	<i>in vitro</i>	Cellules carcinome pulmonaire A549	MWCNT	CVD	NT bamboo+ diamètre extérieur peut varier abruptement le long du NT. Diamètre extérieur : de 3 à 66nm. Longueur : 70nm à 7.8micromètre (attention, NT peuvent être cassés)	TEM, EDS	Nanoparticules contenant en particulier du nickel	Morphologie MEB. Test comètes, +/- traitement Fpg - 5, 10, 40, 100 µg/mL ; 2, 4, 24h.	<i>in vitro</i>	Internalisation, y compris d'amas de plusieurs µm. cassures d'ADN 10 mg/mL ; pas de dommage oxydatif.
Chung	2011	<i>in vivo</i>	<i>Microorganismes</i>	MWCNT					jusqu'à 5000 mg MWCNT/g de sol	Bioessais, sol	L'activités de la 1,4-b-glucosidase, la cellobiohydrolase, la xylosidase, la 1,4-b-N-acetylglucosa-minidase, la phosphatase et la biomasse microbienne ont été mesurées
Corradi	2011	<i>in vitro</i>	Cellules carcinome pulmonaire A549	MWCNT NM-402		Diamètre : 6 – 20 nm Longueur : 0.7 – 4 micromètres Diamètre hydrodynamique (DLS) : 790 nm	TEM	90% Wt MWCNT	Morphologie optique. Comparaison 0 et 10% SVF. CBPI et CBMN (cytokinesis-block proliferation index et micronucleus) 50, 75, 125, 250 µg/mL	<i>in vitro</i>	CBPI : pas de différence +/- SVF CBMN : pas exploitable (particules agglomérées)
Di Giorgio	2011	<i>in vitro</i>	Macrophages de souris, RAW 264.7, transformées par virus leucémie	MWCNT		diamètre extérieur 10 à 25nm, longueur 0.5-50 micron Diamètre (auteurs) 10 – 30 nm / 10 – 30 nm	TEM+microanalyse	MWCNT : mentionnent nanoparticules à base de catalyseur dans	Prolifération: Exposition à 0,25, 10, 25 50, 100 µg/mL 24, 48, 72h. Mitotic index: Exposition à 1, 3, 10, 50 µg/mL 24, 48, 72h. Genotoxicité : 1, 3, 10 µg/mL 48h	/	Génotoxicité dans les différents tests : Micronoyaux (cytokinèse bloquée) - Aberrations chromosomiques, numériques

Auteur	Année	Type d'étude	Cible étudiée	Type NTC	Méthode de synthèse	Diamètres-Longueur-forme	Caractérisations structurales	Impuretés	Concentrations étudiées et durée du traitement	Voie d'exposition	Effets observés ou paramètres étudiés
			(Abelson)			(Producteur) Longueur : 0.5 – 10 micromètres (Auteurs) / 0.5 – 50 micromètres (Producteur) Densité : 2,1 g/ml (auteurs) / 1.7 g/ml at 25 °C (producteurs)		les MWCNT, 10% d'impuretés. Pureté : > 96% Pds (Auteurs)/ Producteur : ~90% carbon basis Ni : 1,5 % Pds, Y : 0.2% Pds et aussi Cl, Na, K			et structurales – Altérations de la chromatine – Cassures dans l'ADN (test des comètes)
				SWCNT		1.2-1.5nm, 2-5 microns.		SW: 50% de SW, 40% d'autres NT (I) et 10% d'autres impuretés			
Fenoglio et al	2012	in vitro + in vivo	murine alveolar macrophages + Rats Wistar	MWCNT		<D> : 9.4 ± 0.3 nm, (3-21 nm) <L> : 0.1 - 1 µm Tubes courbés	TEM Raman : ID/IG=0.93 SSA=240 m2/g	Al, Fe, Co (IPC-AES)	8 mg/kg, étude J3	AOP unique	Augmentation de LDH, ROS, nombre de cellules dans LBA, diminution GSH.
						<D> : 70 ± 2 nm, (13-177 nm) <L> : 1 - 3 µm Aiguilles	TEM Raman : ID/IG=0.33 SSA=60 m2/g	Al, Fe (IPC-AES)			Pas/peu d'effet
Fujitan	2012	in vivo	Souris	MWCNT					2-5 mg/kg b.w. i.p. and 3-5 mg/kg b.w. i.t.	intrapéritonéal ou intratrachéal	altérations développementales à des doses généralement toxiques pour les mères
Ghosh	2011	in vitro	Lymphocytes humains de donneurs sains	MWCNT	CVD	Morphologie Diamètre extérieur : 7 – 15 nm (fournisseur) / 21,55 nm (SEM Auteurs) Diamètre intérieur : 3 – 6 nm Longueur : 0,5 – 200 micromètres Epaisseur des parois : 3–19 graphène layers, bundle diameter : ~44–800 nm (TEM);	SEM, DLS (Déterminent par DLS que 40% des MWCNT font environ 246nm (+/- ???))	?	Stock suspension dans eau distillée ; US 20 min sur glace (100W, 30kHz). Avant usage : dilution H2O + vigoureux vortex 5 min. Incubation 3h – 37°C à 0, 1, 2, 5 µg/mL Test comètes et apoptose/nécrose (Annexine 5/IP cytométrie)	in vitro	Mort cellulaire : nécrose ; peu d'apoptose Test comètes : augmentation significative dès 2 µg/mL; pas de relation dose-effet (moindre à doses plus élevées).
			Souris Swiss albino exposées in vivo ; Cellules de moelle osseuse						Stock suspension dans eau distillée ; US 20 min sur glace (100W, 30kHz). Avant usage : dilution H2O + vigoureux vortex 5 min. 2, 5, 10 mg/kg, 0 et 24h. Post exposition : micronoyaux = 24h ; comètes = 3h	Injection péritonéale	Micronoyaux et comètes : augmentation des anomalies significative dès la dose de 2mg/kg (moindre à doses plus élevées)

Auteur	Année	Type d'étude	Cible étudiée	Type NTC	Méthode de synthèse	Diamètres-Longueur-forme	Caractérisations structurales	Impuretés	Concentrations étudiées et durée du traitement	Voie d'exposition	Effets observés ou paramètres étudiés
Haniu	2011	<i>in vitro</i>	Lignées cellulaires humaines. - Mésothéliome : MESO-1. - Monoblastes : THP-1, différenciées ou non. - Neuroblastome IMR-32. - Épithéliales bronchiques immortalisées : BEAS-2B.	MWCNT	CVD	Diamètre : 150 nm Longueur : 8 micromètres		Pureté : 99.9% (At.) The amount of entrapped metal is less than the detection limit.	Traitement : 1, 10, 50 µg/mL, sauf BEAS-2B (1 µg/mL) pendant 24h. Milieux de culture (+10% SVF) : RPMI avec MESO-1 et THP-1 ; Ham's F12 avec BEAS-2B ; MEM Eagle avec IMR-32. Morphologie et internalisation en microscopie optique. Cytotoxicité. Production d'EADO. Réponse inflammatoire avec THP-1 : production d'IL-6 et IL-18.	<i>in vitro</i>	Morphologie non modifiée par MWCNT. Internalisation par MESO-1, BEAS-2B et THP-1 différenciée ; très faible pour les autres types cellulaires. Diminution significative de la production d'EADO dans les cellules exposées/non exposées, sauf avec IMR-32 (pas d'effet). Production de cytokines par THP-1, différenciées ou non.
Hsieh et al. (Nanotox.)	2012	<i>in vitro</i>	human serum	CNT		D : 5-100 nm L : 0.5-100 µm	MET, adsorption d'azote	Fe, Co, Cr, Ni, Mo, Mn, La, Zn (ICP-MS)			
Jain et al.	2011	<i>in vivo</i>	souris male Swiss	MWCNT		D: ND L: agrégats	MEB, DLS	Ni 0.081 %m Fe 2.31 %m Zn 2.29 %m (EDAX)	10mg/kg (25mg/anim.), 7 et 28 jours	1 dose en intraveineuse	La toxicité diminue avec le taux d'oxydation
						1h : Agrégats 2h : 1-2 µm (516.6 nm DLS)		Ni 0.041 %m Fe 0.005%			
Kato	2012	<i>in vitro</i>	Cellules carcinome pulmonaire A549	MWCNT		80% 10-110nm Ø ; 70% 1-4 µm longueur			Suspension solution saline + 0,005% Tween-80 ; US 5-10min température ambiante. Test micronoyaux. Suspension mélangée 1 : 9 avec milieu de culture avec sérum. Durée de traitement : 6 h, puis délai de culture 48 h.	<i>in vitro</i>	Inhibition de la prolifération cellulaire. Augmentation significative de la fréquence de micronoyaux avec 20, 100, 200 µg/mL, par rapport au contrôle (milieu + 0,005% tween 80 en final).
			Cellules ovariennes de hamster chinois, AA8						Test échanges de chromatides sœurs (ECS). Durée de traitement : 1 h, puis délai de culture 28 h.	<i>in vitro</i>	Augmentation significative de la fréquence d'ECS avec 0,1 ; 1 et 2 µg/mL, par rapport au contrôle (milieu + 0,05% tween 80).
		<i>in vivo</i>	Souris ICR						Test comètes : 0,05 et 0,2 mg/kg (5 souris/lot). Sacrifice 3 h après instillation. Adduits ADN : 0,2 mg/kg (5 souris/lot). Sacrifice 3, 24, 72 ou 168h après instillation. Extraction ADN pulmonaire.	Instillation intratrachéale	Augmentation significative, dose-dépendante, de l'endommagement de l'ADN (comètes). Augmentation significative des adduits à l'ADN.
			Souris C57BL/6j, génétiquement						Mutations sur le gène gpt. 0,2 mg/kg (6 ou 7 souris/lot) ; groupes 1, 2 et 3 : respectivement	Instillation intratrachéale	Mutations : Augmentation significative dans le groupe 3

Auteur	Année	Type d'étude	Cible étudiée	Type NTC	Méthode de synthèse	Diamètres-Longueur-forme	Caractérisations structurales	Impuretés	Concentrations étudiées et durée du traitement	Voie d'exposition	Effets observés ou paramètres étudiés
			<i>modifiées, porteuses du gène gtp delta</i>						1, 2 ou 4 instillations. Sacrifice 8 à 12 semaines après instillation. Extraction de l'ADN pulmonaire. Analyses histologiques		(4 instillations). Histologie : Groupe 2 : infiltration de macrophage dans alvéoles pulmonaire ; inflammation ; hyperplasie bronchique et alvéolaire ; CNT dans la région sous pleurale. Effets plus marqués dans le groupe 4
Kim	2012	<i>in vivo</i>	Rats Sprague-Dawley	MWCNT		Ø : 10-15 nm ; L : ≈ 20 µm.			Inhalation : 5h/jour, 5 jours. Doses mesurées : 0,163 – 0,339 – 0,94 mg/m ³ . Mesures : H2O2 dans LLBA. test des comètes sur cellules isolées du poumon. délais = 5 jours, 1 mois post-exposition	Inhalation	Concentration en H ₂ O ₂ augmentée mais pas significatif. Comètes augmentation du moment de la comète, significatif pour 0,94 mg/m ³ . Dépôt des nanotubes dans l'avéole ; présence dans macrophages, cellules épithéliales alvéolaires à 5 jours et persistant à 1 mois.
Lacerda	2012	<i>in vitro</i>	<i>phagocytic and non-phagocytic cell lines</i>	CNT		Diamètre externe : 20 – 30 nm Longueur : 0.5 – 2 micromètres		Pureté : 94% (producteur)	50-100 µg/ml	<i>in vitro</i>	Etude des mécanismes de pénétration cellulaire. 30-50 % de l'uptake est indépendant des phénomènes d'endocytose
Li et Huang	2011	<i>in vivo</i>	Daphnie (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	MWCNT	CVD lit fluidisé Fe(CO) ₅ puis purification acide	14.1 (10–20) nm (MWCNT-1), 34.6 (30–40) nm (MWCNT-2), and 59.2 (50–70) nm (MWCNT-3) Pas d'infos sur la longueur	Dans article Carbon 2005 : XRD + TEM. potentiel zeta, DLS, TOC (total organic carbon) analysis pour concentration en solution	Fe (non dosé)	variables selon les tests : toxicité aiguë (24h, 1-200mg/L); croissance (48h, O-NTC: 0-100mg/L, US-NTCs: 0-10 mg/L); reproduction (8j, gamme), ingestion (24h, 10mg/L), dépuration (60mn)	acqureuse	impact plus élevé des MWNTCs traités à l'ozone sur les paramètres étudiés (toxicité aiguë, croissance, reproduction, ingestion, élimination)
Mald	2011			SWCNT	High-pressure carbon monoxide (HiPCO)	Morphologie FeSW – CNTs : 578 m ² /g SW-CNTs Surface spécifique : 155 m ² /g		Composition Chimique FeSW – CNTs : Fe : 22.8% SW-CNTs - Fe : 1.1% Pds			
Mercer et al.	2010	<i>in vivo</i>	<i>mice</i>	MWCNT		D : 49 ± 13.4 nm L : 3.86 µm (GSD 1.94)	Voir Porter Toxicology 269, 136 (2010)	0.41% Na, 0.32% Fe			

Auteur	Année	Type d'étude	Cible étudiée	Type NTC	Méthode de synthèse	Diamètres-Longueur-forme	Caractérisations structurales	Impuretés	Concentrations étudiées et durée du traitement	Voie d'exposition	Effets observés ou paramètres étudiés
Mercer et al.	2011	<i>in vivo</i>	Souris C57Bl/6	MWCNT		D : 49 ± 13.4 nm L : $3.86 \mu\text{m}$ (GSD 1.94)	TEM, SSA (BET)=26m ² /g	0.41% Na, 0.32% Fe (ICP-AES)	0.25, 0.5, 1, 2 mg/kg- Etude J1, 7, 28, 56	AOP unique	D56 distribution principalement dans MA (68% de la charge pulmonaire a D56) et dans granulomes (20%). Pénétration dans l'interstitium alvéolaire rapide et pas de redistribution
Morimoto	2011	<i>in vivo</i>	Rats Wistar	SWCNT					IT: 0.66 et 3.3 mg/kg- Etude J3, 30, 90 <u>Inhalation</u> : 0.37mg/m36h/jx 5j/semx4sem	Inhalation et IT	IT: petites lésions granulomateuses et dépôt de collagène transitoire, Augmentation CINC-1 et MPO et nombre de cellules dans le LBA- <u>Inhalation</u> : NTC individualisées a 70%, augmentation CINC1, 2, 3 et MPO seulement a J3
Mühlfeld	2011	<i>in vivo</i>	souris C57Bl/6	CNT		14.84 ± 0.5 nm	1-5 μm	Fe 17600 Cu 105.2 Ni 53.3 $\mu\text{g/g}$	0.4 mg/kg- Etude a J1 (inflammation) J28 (stereologie)	AOP unique	tubes longs: augmentation IL-6, TNF- α dans les macrophages, hypertrophie pneumocytes II- Tubes courts: augmentation PMN et fibrose
						84.89 ± 1.9 nm	13 μm	Fe 3426.9 Co 114.5 Cu 27.7 $\mu\text{g/g}$			
Nagai et al.	2011	<i>in vitro</i>	human mesothelial cells	MWCNT		D : 50 ± 0.63 nm L : $5.29 \pm 0.12 \mu\text{m}$		Fe, Cu (ICP-MS)			
						D : 52.4 ± 0.72 nm L : 4.6 ± 0.1 D : 116.2 ± 1.6 L : 4.88 ± 0.1 D : 143.5 ± 1.6 nm L : 4.34 ± 0.88 D= 15 (ND) L : ND		Fe (ICP-MS)			

Auteur	Année	Type d'étude	Cible étudiée	Type NTC	Méthode de synthèse	Diamètres-Longueur-forme	Caractérisations structurales	Impuretés	Concentrations étudiées et durée du traitement	Voie d'exposition	Effets observés ou paramètres étudiés
Pacurari	2011	<i>in vivo</i>	Souris C57BL/6j	MWCNT	-	Structure cristalline (20 à 50 feuillets) Diamètre : 49±13,4 nm (S.D.) Longueur médiane : 3,86 micromètres (GSD 1.94)	cf. Porter, D.W., et al., 2010. <i>Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes</i> . Toxicology 269, 136–147.	Traces de métaux = 0,78%, (sodium: 0.41% et fer: 0.32%)	10, 20, 40, 80 µg/souris ; 8 souris par groupe. Contrôles : milieu de dispersion (PBS sans Ca ²⁺ et Mg ²⁺ , pH 7,4 ; 5,5mM d-glucose ; 0,6 mg/mL albumine sérique de souris, et 0,01 mg/mL 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Délai post-exposition ; 7 jours et 56 jours.	Aspiration pharyngée	Etude de l'expression de gènes sélectionnés, par PCR (qPCR). Sélection de 63 gènes, sur la base d'études de signatures de cancer du poumon humain, et de gènes de voies de signalisation. Expression différentielle traités/contrôles : groupe de 7 et 11 gènes après 7 et 56 jours ; 4 gènes présents aux deux temps post exposition.
Petersen et al. (Environ. Tox. Chem.)	2010	<i>in vivo</i>	earthworms or oligochaetes	MWCNT	CVD méthane ¹⁴ C	D : 30-70 nm <L> : 386 nm (MEB) 222±14 (DLS)	MEB, DLS, XPS	Ni, Mg, O (1% ATG)			
						D : 30-70 nm <L> : 407 nm (MEB) 277±30 (DLS)		Ni, Mg, O (0.3% ATG)			
Petersen et al. (Environ. Sci. Technol.)	2011	<i>in vivo</i>	<i>Daphnia magna</i>	MWCNT	CVD méthane ¹⁴ C						
Ponti	2012	<i>in vitro</i>	Fibroblastes de souris Balb/3T3	MWCNT	CVD	Morphologie (MET) Nanocyl-7000, Nanocyl-3101 : Diamètre moyen 10 nm, Longueur 1,5 micromètre Nanocyl-3152, Nanocyl-3153 : Diamètre moyen 10 nm, Longueur < 1 micromètre	MET	Nanocyl-7000 : 10% (w/v) d'impuretés métalliques. Nanocyl-3101, 3152, 3153 : < 5%	Morphologie, MEB et MET : 72h à 100 µg/mL. Toxicité : CFE Traitement (1, 10, 100 µg/mL), génotoxicité (micronoyau) : 24h ; transformation morphologique : 72h et délai d'expression 5 semaines.	<i>in vitro</i>	Morphologie TEM : internalisation de -NH ₂ et -OH ; pas d'internalisation avec CNT nude et -COOH. Absence de génotoxicité (micronoyaux, cytokinèse bloquée) Transformation (foyers) avec tous les échantillons, significatif : -NH ₂ et -COOH (1 µg/mL) ; -OH (10 µg/mL) ; nude (100 µg/mL)

Auteur	Année	Type d'étude	Cible étudiée	Type NTC	Méthode de synthèse	Diamètres-Longueur-forme	Caractérisations structurales	Impuretés	Concentrations étudiées et durée du traitement	Voie d'exposition	Effets observés ou paramètres étudiés
Ronzani	2012	<i>in vivo</i>	Souris Balb-c	MWCNT (GRAPHISTRENGTH C100)	CVD	Dimension moyenne de l'agglomérat : 200 – 500 micromètres Diamètre moyen extérieur : 10 – 15 nm (données Arkema) Longueur : 0,1 – 10 ³ micromètres (données Arkema)	MET	Al : 2,40% Fe : 2,21/ Free amorphous Carbon : Not Detectable	0.06, 0.25, 1 mg/kg- Etude à J1 à J21 (J7 après dernière administration)	AOP unique ou répétée (J0, J7 et J14)	<u>Administration unique:</u> augmentation PMN dans le LBA, TNF- α , KC, IL-17, présence des NTC dans les macrophages- <u>Administration répétée:</u> Augmentation macrophages, PMN, eosinophiles, KC, TGF- β , collagen. Présence de granulomes, NTC contenus dans les macrophages, pneumocytes II et PMN
Rothen	2010			MWCNT		D : 20-100 nm, L : 50 μ m	SSA 180 m ² /g	Fe: 5.1 $\pm$ 0.6			
						D : 100-150 nm, L : 10 μ m	SSA 25 m ² /g	Fe: 1.3 $\pm$ 0.1 (+ trace S)			
Tabet	2011		macrophages RAW 264.7 , Souris Balb/c			D : 12 $\pm$ 1 nm, L : 0.1-13 μ m	SSA 227.4 m ² /g	Al 3.2%, Fe 2.45%	In vitro : 6 et 24 heures, 0.1 à 100 μ g/ml ; in vivo 10 or 100 μ g/souris	intratrachéale	Diminution de la toxicité avec un polymère contenant un monomère polystyrène
Takaya et al.	2010	<i>in vivo</i>	<i>rats</i>	MWCNT		D : 88 $\pm$ 5 nm (40-173 nm) L : 5 $\pm$ 4.5 μ m (0.5-21.8 μ m)		Fe, Cr and Ni, 4,400, 48 and 17 ppm (wt/wt) (LA-ICP-MS)			
Thurnherr	2011	<i>in vitro</i>	Cellules humaines de leucémie, transfectées neo Jurkatt-neo	MWCNT		D externe : 6-24 nm ; L : 2-5 μ m (Thurnherr et al 2009)			Toxicité long terme (0,5 μ g/mL, 6 mois) Morphologie Internalisation	<i>in vitro</i>	Toxicité aiguë étudiée dans le précédent article Toxicité long terme (0,5 μ g/mL, 6 mois) Morphologie non modifiée. Pas de MWCNT associés aux cellules : peu d'internalisation

Auteur	Année	Type d'étude	Cible étudiée	Type NTC	Méthode de synthèse	Diamètres-Longueur-forme	Caractérisations structurales	Impuretés	Concentrations étudiées et durée du traitement	Voie d'exposition	Effets observés ou paramètres étudiés
			Cellules carcinome pulmonaire A549						<u>Toxicité aiguë</u> : Mort cellulaire (15-30 µg/mL ; 3, 6 jours) Production d'EADO (3,2-6,25-12,5-25 µg/mL) Test comètes (7,5 ; 30 µg/mL) Test micronoyaux (2,8 ; 11,25 µg/mL) <u>Toxicité long terme</u> (0,5 µg/mL, 6 mois) Morphologie Internalisation Production d'EADO Prolifération	<i>in vitro</i>	<u>Toxicité aiguë</u> : Mort cellulaire : apoptose/nécrose modérées (significatif 30 µg/mL) Production d'EADO : augmentée Test comètes : négatif Test micronoyaux : négatif. <u>Toxicité long terme</u> (0,5 µg/mL, 6 mois). Morphologie non modifiée MWCNT associés aux cellules ; internalisation Production d'EADO identique à contrôles sans MWCNT ; production en présence d'une nouvelle exposition à 30 µg/mL. Prolifération non modifiée
Velzeboer	2011	<i>in vivo</i>	Communautés des macroinvertébrés benthiques	CNT					Concentrations: 0, 0,002, 0,02, 0,2, 2g/Kg; Durée: 3 mois	Sédiment	Pas d'effet des MWNTC sur la biodiversité; pas d'impact sur les changements des communautés
Wang Xiang et al.	2011	<i>in vivo</i>	souris C57Bl/6	MWCNT		D : 20-30 nm L : 10-30 µm	SEM	4.49% mass. Ni, 0.76% mass. Fe	0.5, 1, 2, 4 mg/kg Etude à J3	AOP unique	Augmentation cytokines inflammatoires et fibrogéniques- Augmentation collagène. Effet plus importants pour les NTC disperses
Wang Xiaojia et al.	2011	<i>in vivo</i>	souris C57Bl/6	MWCNT		D : 10-40 nm, bimodal (12.5 et 25 nm) L : plusieurs microns (sic)	MET, MEB, Raman, SSA=103.1m ² /g	4.8% mass. Fe (ATG, EDX, dans Si)	1, 2, 4 mg/kg Etude à J30	AOP unique	Augmentation expression IL-33, MMP-13, chemokines MIP-1a et eotaxin- Altération fonctionnelles- Granulomas et foyer fibrose en périphérie

Annexe 2 : Techniques de laboratoire

Les techniques mentionnées ci-dessous sont celles des tests normalisés de l'OCDE (Lignes directrices). Dans de nombreux travaux à visée mécanistique sur les NTC, la méthodologie a dû être adaptée, aussi bien au type cellulaire utilisé qu'à la nature particulière des substances particulières comme les NTC.

Test *in vitro* de numération des micronoyaux

Objectif : C'est un test de génotoxicité permettant la détection des micronoyaux (fragments de chromosomes ou chromosomes entiers) dans le cytoplasme de cellules de mammifères en interphase. C'est un test à court terme qui permet d'identifier les agents physiques ou chimiques clastogènes ou aneugènes ; il témoigne d'une ségrégation anormale des chromosomes au cours de la division cellulaire.

Principe : Les micronoyaux contiennent des fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire sans centromère), ou de chromosomes entiers. L'essai détecte l'activité de substances clastogènes ou aneugènes dans les cellules. Cette Ligne directrice prévoit l'utilisation de protocoles avec et sans cytochalasine B (inhibiteur de polymérisation de l'actine). La cytochalasine B empêche la cytokinèse, permettant ainsi l'identification et l'analyse sélective de la fréquence des micronoyaux dans les cellules qui ont complété une mitose, ces cellules étant binucléées. La Ligne directrice permet l'utilisation de protocoles sans blocage de la cytokinèse à condition qu'il soit démontré que la population cellulaire a subi une mitose. En effet, certains agents - c'est le cas des fibres minérales - provoquent la formation de cellules bi/multi nucléées.

Référence : Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Essai n° 487 : Essai *in vitro* de micronoyaux sur cellules de mammifères.

Test des comètes

Objectif : Le **test des comètes** permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages et enfin lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose. Ce test permet d'établir une relation dose-effet.

Principe : C'est un test d'électrophorèse de cellules isolées, en gel d'agarose en condition alcaline, en absence ou en présence de formamido-pyridine ADN glycosylase (Fpg) pour la recherche de dommages oxydatifs. Après électrophorèse, les noyaux dont l'ADN a subi des cassures prennent une forme de comète et les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé restent ronds. On mesure les paramètres de la comète : pourcentage d'ADN dans la tête et dans la queue de la comète ; moment (% d'ADN x longueur de la queue). Rapide, sensible, il nécessite peu de cellules et apporte généralement une réponse en 48 heures.

Essai d'échange de chromatides-sœurs

Objectif : L'essai d'échange de chromatides-sœur (SCE, *Sister chromatid exchange*) est un essai à court terme pour la détection des échanges réciproques d'ADN entre deux chromatides-sœur d'un chromosome répliquant son ADN.

Principe : La détection des SCE exige quelques moyens de marquages différents pour chacune des chromatides sœur, ce qui peut être fait par exemple par incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU) dans l'ADN chromosomique pendant deux cycles cellulaires. Des SCE peuvent être détectés dans les cellules de mammifère ou autres cellules. La substance à tester devrait être sous forme solide, liquide, vapeur ou gazeuse.

Des cellules de mammifères sont exposées au produit à tester avec et sans système d'activation métabolique exogène de mammifère, et cultivées *in vitro* pendant deux cycles cellulaires dans un milieu contenant de la BrdU. Au moins trois concentrations de la substance à tester, espacées de façon adéquate, doivent être employées. Les chromosomes sont examinés dans les cellules bloquées en métaphase par un inhibiteur du fuseau mitotique.

Référence : Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Essai n° 479 : Toxicologie génétique : Essai *in vitro* d'échange de chromatides-sœurs sur cellules de mammifère.

Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères

Objectif : Le but de l'essai *in vitro* d'aberration chromosomique est d'identifier les agents qui causent des aberrations chromosomiques structurales (chromosomiques ou chromatidiques par exemple) dans les cellules mammifères cultivées.

Principe : Des cultures cellulaires sont exposées à la substance à tester (liquide ou solide), avec et sans activation métabolique, pendant environ 1,5 fois le cycle cellulaire normal. Au moins trois concentrations analysables de la substance d'essai doivent être employées. À intervalles prédéterminés après exposition des cultures de cellules à la substance d'essai, les cellules sont traitées avec une substance qui bloque la métaphase, récoltées et teintées. Les cellules métaphasiques sont analysées au microscope pour déceler les aberrations chromosomiques.

Référence : Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Essai n° 473: Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères.



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