Série thématique

Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées

Pascal ANDUJAR[1-3], Sophie LANONE[1,2], Patrick BROCHARD[4,5], Jorge BOCZKOWSKI[1,2]

Contributions :

Pascal ANDUJAR : c (écriture de l'article)

Sophie LANONE : c (écriture de l'article)

Patrick BROCHARD : r (relecture de l'article)

Jorge BOCZKOWSKI : c (écriture de l'article)

Affiliations

1- INSERM, Unité 955, Créteil, F-94000, France
2- Université Paris 12, Faculté de médecine, Créteil, F-94000, France
3- Hôpital Intercommunal de Créteil, Service de pneumologie et pathologie professionnelle, Créteil, F-94000, France
4- Laboratoire Santé Travail Environnement, EA-3672, IFR 99, F-33076 Bordeaux, France
5- Université Bordeaux 2, Faculté de médecine, Bordeaux, F-33076, France

Titre court : Effets respiratoires des nanoparticules

Auteur correspondant : Pascal Andujar

Adresse :

Hôpital Intercommunal de Créteil

Service de Pneumologie et de Pathologie Professionnelle

40 avenue de Verdun

F-94000 CRETEIL

Tel : 01.57.02.20.90

Fax : 01.57.02.20.99

Adresse électronique : pascal.andujar@chicreteil.fr

Résumé :

Les nanotechnologies sont définies comme l'ensemble des techniques visant à concevoir, caractériser et produire des matériaux à l'échelle du nanomètre dans au moins l'une de leurs dimensions. Ces nanomatériaux sont eux-mêmes constitués de nano-objets (nanoparticules, nanotubes…). Leur dimension nanométrique leur confère, du fait des lois de la physique quantique, de nouvelles propriétés physicochimiques et des comportements inédits. Les applications des nanotechnologies sont multiples (cosmétologie, industrie, médecine...). La production et l'utilisation des nanomatériaux connaissent une croissance importante. Cependant, des inquiétudes sont émises sur les effets potentiels des nanoparticules sur la santé, à court et à long terme. Ces questions sont motivées par la connaissance des effets toxiques sur la santé des particules micrométriques de la pollution atmosphérique et par la crainte de voir ces effets s'amplifier du fait de la nanodimension de ces matériaux. Dans cet article, est proposée une synthèse globale mais non exhaustive des connaissances actuelles concernant la pénétration, la déposition, la translocation et l'élimination dans l'appareil respiratoire, ainsi que les effets respiratoires des nanoparticules métalliques (plus particulièrement du dioxyde de titane) et des nanotubes de carbone. L'ensemble des études expérimentales *in vivo* et *in vitro* actuellement disponibles met en évidence l'existence d'effets biologiques des nanoparticules sur l'appareil respiratoire avec, notamment, la génération de stress oxydant, un effet pro-inflammatoire, un effet pro-thrombotique, la possibilité de survenue de fibrose et d'emphysème pulmonaire ou de dommages à l'ADN. Une meilleure connaissance des effets biologiques potentiels des nanoparticules

est requise, afin de mettre en place des mesures de prévention appropriées en milieu de travail et/ou en population générale, si cela s'avérait nécessaire.

Mots-clés : nanomatériaux ; nanoparticules ; nanotubes ; poumon ; toxicité.

Title : Respiratory effects of manufactured nanoparticles

Summary :

Nanotechnology, defined as techniques aimed to design, characterize and produce materials on a nanometer scale, is a fast-growing field today. Nanomaterials are made of nanoobjects (nanoparticles, nanofibers, nanotubes...). The nanoscale confers on these materials their novel, hitherto unknown, chemical and physical properties by the laws of quantum physics which are essentially expressed on this scale. Nanotechnology applications are numerous (e.g., cosmetics, industry and medicine) and they keep growing. We can safely predict that the production and utilization of nanomaterials will increase greatly in the years to come. Nonetheless, the same properties that make these nanomaterials very attractive are a source of concern: there are questions about their potential toxicity, their long-term side effects, and their biodegradability. These questions are based on knowledge of the toxic effects of micrometric particles in air pollution and the fear that these effects will be amplified because of the nanometric size of the new materials. We present in this article a global but not exhaustive summary of current knowledge. We begin by defining lung penetration, deposition, translocation and elimination of nanoparticles. Finally, we consider the respiratory effects of metallic nanoparticles, titanium dioxide nanoparticles in particular, and carbon nanotubes. In vivo and in vitro experimental studies currently available highlight the existence of biological effects of nanoparticles on the respiratory system with generation of oxidative stress, pro-inflammatory and pro-thrombotic effects and the possible development of fibrosis and pulmonary emphysema or DNA damage. A better understanding of the potential

biological effects of nanoparticles is required to implement appropriate preventive measures in the workplace and/or in the general population, if this should be necessary.

Key words : nanomaterials ; nanoparticles ; nanotubes ; lung ; toxicity.

Introduction

Le terme de « nanotechnologie » est implicitement associé à l'innovation et à des technologies prometteuses. Les nanotechnologies comprennent la conception, la caractérisation, la production et l'application de nanostructures, de nanodispositifs ou de nanosystèmes. Elles sont considérées actuellement comme l'étape technologique la plus avancée de la miniaturisation, intégrant la technologie, la biologie, la chimie et la physique. Les nanosciences sont définies par l'étude des phénomènes générés par des nanomatériaux. Du fait de leur taille nanométrique et des lois de la physique quantique, les nanoparticules (NP) ont des comportements inédits par rapport aux matériaux de même composition chimique à plus grande échelle. En effet, la taille nanométrique de ces structures entraîne une augmentation de la proportion des atomes présents à leur surface, pouvant conduire à une plus grande réactivité de surface, une résistance élevée et des propriétés électriques modifiées. Les applications technologiques sont nombreuses, notamment dans les secteurs industriels innovants, tels que l'industrie cosmétique (écrans solaires, rouges à lèvres, pâtes dentifrices…) [1,2], l'industrie automobile (peintures, pneumatiques, lubrifiants, pare-brise…) [3,4], le secteur de la santé (pharmacocinétique et biodisponibilité des médicaments, matériels prothétiques, imagerie moléculaire…) [5,6].

L'impact des nanotechnologies sur le marché économique mondial est considérable. Les financements gouvernementaux alloués à la « nanorecherche » sont ainsi passés d'un peu moins de 500 millions de dollars en 1997 à plus de 3,5 milliards en 2004 [7]. Selon le National Science Foundation, en 2015, la part prévisible des nanotechnologies dans le revenu mondial est d'environ 1000 milliards de dollars [8].

Cependant, face à ces nouvelles technologies prometteuses et de plus en plus répandues dans notre vie quotidienne, la question des effets des nanotechnologies sur la santé humaine (en milieu de travail ou en population générale) et sur l'environnement est en suspens. En effet, des inquiétudes sont émises au regard des propriétés mêmes qui rendent attractifs les nanomatériaux et leur utilisation (grande réactivité de surface, capacité à traverser les membranes cellulaires...). Ces questions sont motivées par la connaissance des effets toxiques sur la santé des particules micrométriques de la pollution atmosphérique [9-15], et la crainte de les voir s'amplifier du fait de la nanodimension des matériaux impliqués. La recherche sur les propriétés toxicologiques des nanomatériaux et sur leurs effets potentiels sur la santé humaine et l'environnement est actuellement en plein essor. Cependant, de nombreux éléments sont encore méconnus : notamment le repérage des situations d'exposition (secteurs de fabrication, d'utilisation et d'application) et les niveaux d'exposition aux nanomatériaux manufacturés. De plus, l'évaluation des risques doit non seulement tenir compte des effets potentiels des nanomatériaux natifs, mais elle doit également prendre en compte leurs comportements et l'ensemble de leur cycle de vie (mode de fabrication, utilisation, vieillissement, biodégradabilité…). Actuellement, les connaissances des effets toxicologiques des NP sur la santé humaine, reposent essentiellement sur des études expérimentales *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Dans cet article, est proposée une synthèse globale mais non exhaustive, compte tenu de la complexité du sujet, des connaissances actuelles concernant la pénétration, la déposition, la translocation et l'élimination dans l'appareil respiratoire, ainsi que les effets respiratoires des NP et plus particulièrement ceux des NP métalliques, avec plus spécifiquement le dioxyde de titane (TiO_2) et des nanotubes de carbone (CNT pour Carbon NanoTubes en anglais).

1. Généralités

1.1. Définitions

Les nanomatériaux sont constitués de nano-objets, définis par au moins une dimension nanométrique (1 à 100 nm). Si l'une de leurs dimensions est nanométrique, il s'agit de nanofeuillet (graphite par exemple). Si l'objet a une structure nanométrique bidimensionnelle, il s'agit alors de nanotube ou nanofil, les plus connus étant les CNT, découverts en 1991 [16], mesurant quelques nanomètres de diamètre et jusqu'à plusieurs micromètres de long. Enfin, si c'est la structure tridimensionnelle de l'objet dans son ensemble qui est nanométrique, il s'agit alors de nanoparticule (NP).

1.2. Sources d'émission des nanoparticules

Il existe deux types de sources d'émission ou de production des NP : une origine naturelle (éruptions volcaniques, incendies de forêts, pollution marine…) et une origine anthropogénique non intentionnelle (pollution industrielle, émissions Diesel, combustions diverses, pollution intérieure des bâtiments…) et intentionnelle (NP manufacturées par l'industrie ou produites dans des laboratoires de recherche).

La nature chimique des NP peut être plus ou moins complexe : d'origine minérale (graphite, hématite, silicasol…), métallique (SiO_2, TiO_2…) ou organique [composés carbonés : fullerènes C60, CNT monoparoi (ou monofeuillet, SWCNT en anglais pour « Single Wall Carbon NanoTubes ») et multiparois (ou multifeuillets, MWCNT en anglais pour « Multiple Wall Carbon NanoTubes) ; polymères : polystyrène, nylon, dextrane…]. Les NP peuvent être également issues de mélanges plus ou moins complexes selon

leur processus de génération (chauffage de polytétrafluoroéthylène (PTFE ou téflon), fumées de soudure, suies de combustion d'un hydrocarbure ou d'un polymère). De plus, une NP peut être composée d'un noyau particulaire sur lequel peuvent être adsorbés des polluants, comme des métaux de transition, des hydrocarbures ou des substances biologiques (endotoxines…).

2. Déterminants des effets toxiques des nanoparticules sur la santé

Par analogie avec les particules ultrafines de la pollution atmosphérique, les effets des nanomatériaux sur la santé seraient également fonction de plusieurs paramètres souvent corrélés : taille, nombre et/ou surface, forme, composition chimique, traitement de surface et potentiel d'agrégation/agglomération. Peu de données toxicologiques sont disponibles actuellement chez l'Homme [17-19].

2.1 Taille des nanoparticules

Selon un modèle développé en 1994 et s'appliquant aux particules inhalées sous forme de particules bien individualisées à une taille déterminée et non sous forme d'agrégats, la déposition des NP inhalées dans chacune des trois régions du tractus respiratoire (le nasopharynx, l'arbre trachéobronchique et la région alvéolaire), dépendrait largement de leur dimension, ce qui pourrait avoir des conséquences sur leurs effets potentiels [20]. Ce point est développé plus loin dans le chapitre 3. La taille de la NP est également

intrinsèquement liée à sa surface relative, au moins dans le cas des nanomatériaux solides.

2.2. Forme des nanoparticules

La forme des NP conditionne leurs effets biologiques. Les NP manufacturées peuvent avoir des formes très diverses (par exemple : sphériques, fibreuses, tubulaires, circulaires et planes). Il est bien établi dans des études toxicologiques expérimentales *in vitro* et *in vivo* sur les particules sphériques et fibreuses de taille micrométrique que les particules fibreuses naturelles, comme l'amiante, ou manufacturées, comme les fibres vitreuses, sont associées à des effets cytotoxique et génotoxique accrus et à un risque augmenté de survenue de fibroses pulmonaires et de cancers bronchopulmonaires [21,22]. Les paramètres critiques sont la dose, la taille et la biopersistance des fibres. La biopersistance des formes fibreuses est une caractéristique importante, car plus elles restent longtemps au contact des cellules, plus leurs effets biologiques peuvent être importants [22]. Les fibres ont une biopersistance plus longue que les particules sphériques. Des études toxicologiques sur des particules de TiO_2 ont montré que la forme fibreuse est plus cytotoxique que la forme sphérique. Watanabe et coll. ont exposé des macrophages alvéolaires de rat à des concentrations similaires de particules TiO_2 fibreuses et sphériques (1-2 µm) [23]. L'observation par microscopie électronique a montré des changements vacuolaires et des dommages des surfaces cellulaires de macrophages exposés à des particules fibreuses de TiO_2 (700 nm). En revanche, aucun changement significatif n'a été observé chez les macrophages

exposés à des particules sphériques de TiO_2. En accord avec ces résultats, un relargage plus important de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture, index de cytotoxicité, a été mesuré après exposition aux particules fibreuses de TiO_2 [23]. Les résultats de ces expériences suggèrent que la cytotoxicité du TiO_2 dépend clairement de la forme du matériel. Même si ces données sont issues d'études à partir de particules supérieures à 100 nm, il semble licite de penser que la forme des NP doit également jouer un rôle dans leurs effets biologiques.

2.3. Surface des nanoparticules et réactivité de surface

Dans le domaine de recherche des particules ultrafines de la pollution atmosphérique, plusieurs travaux *in vivo* chez l'animal ont montré que différents paramètres, tels que l'afflux des polynucléaires neutrophiles dans les poumons, la modification de la perméabilité de l'épithélium pulmonaire, ou encore l'accumulation dans les ganglions lymphatiques, sont corrélés à la surface totale des particules administrées [21,24,25]. La petite taille et la grande surface spécifique correspondante des nanomatériaux solides leur confèrent des propriétés spécifiques, comme par exemple, des effets catalytiques de réactions chimiques. L'importance de la surface devient évidente, lorsque la surface des atomes ou des molécules est prise en considération, jouant un rôle essentiel dans la détermination des propriétés physicochimiques des nanomatériaux [19] ; le ratio surface sur nombre total d'atomes ou de molécules augmente de façon exponentielle avec la diminution de la taille de la particule. Comme les réactions chimiques surviennent à la surface, ceci signifie que les nanomatériaux pourraient être plus réactifs

que ces mêmes matériaux composés de particules de plus grande taille. Par exemple, dans un volume inhalé comportant une concentration de 10 µg/m^3 d'air, le nombre de particules de 5 µm est de 0,15/ml, alors que le nombre de NP de 5 nm est de 153 x 10^6/ml, soit une augmentation d'un facteur 10^9 par rapport aux particules de 5 µm. Leur surface totale respective est de 12 µm^2/ml et de 12000 µm^2/ml, soit une augmentation d'un facteur 1000 par rapport aux particules de 5 µm de la surface de contact avec les membranes cellulaires et les molécules biologiques, expliquant une plus grande réactivité biologique des NP à concentration massique de particules égale, avec une production de radicaux libres, un stress oxydant et un potentiel proinflammatoire accrus [26].

2.4. Compositions chimiques des nanoparticules

La composition chimique des NP est un autre paramètre conditionnant leurs effets biologiques. En effet, la nature métallique de la particule ou la présence de métaux de transition, impuretés du processus de fabrication, peuvent également être des déterminants des effets biologiques. En effet, les métaux de transition, provenant de NP non manufacturées, sont impliqués dans la génération de radicaux libres de l'oxygène, molécules très réactives pouvant moduler différents processus biologiques et causer des dommages cellulaires [19]. Par exemple, il a été montré que le fer est impliqué dans les effets pathologiques des particules issues de la pollution atmosphérique urbaine [27,28]. La biodisponibilité du fer provenant de particules en contact avec des cellules épithéliales est dépendante de la taille et décroît avec l'augmentation de la taille de la

particule [29]. Dans ce cas, le fer était responsable de l'induction d'une cytokine proinflammatoire, l'interleukine IL-8. En accord avec ce résultat, Shvedova et coll. suggèrent que les propriétés redox du fer sont un des mécanismes de cytotoxicité des CNT sur des kératinocytes humains [30].

2.5. Degrés d'agrégation/agglomération des nanoparticules

Les NP sont plus ou moins douées de propriétés d'agglomération et/ou d'agrégation. En effet, les NP soumises aux forces de Van der Waals, électrostatiques ou aux tensions de surface, tendent à s'agglomérer entre elles [31]. De même, les NP peuvent également s'agréger entre elles, si elles sont soumises à des forces plus importantes, rendant ainsi leur séparation plus difficile. Ces agglomérats ou agrégats, allant jusqu'à une dimension micrométrique, peuvent avoir des formes complexes et sont difficiles à caractériser. Les phénomènes d'agglomération et d'agrégation des NP peuvent laisser supposer une déposition différente dans l'appareil respiratoire du fait de la modification de leur diamètre aérodynamique. De plus, comme le laissent supposer les travaux de Wang et coll. sur le tractus digestif, l'agrégation peut influencer la tolérance aux particules. En effet, l'administration orale de NP de zinc induit le décès d'animaux, lorsque les NP s'agrègent dans le tractus gastro-intestinal, alors que les particules de zinc de taille micrométrique n'induisent pas de tels effets [32].

De façon tout à fait intéressante, la capacité de ces matériaux à former des agrégats par adsorption de protéines a une influence importante dans la clairance des particules et dans leurs effets immunologiques et toxicologiques. Kendal et coll. ont mis des NP de

noir de carbone (25 à 100 nm) avec des traitements de surface différents en présence de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) dans du milieu de culture et ont observé l'agglomération des NP en 1 heure. En effet, des changements dans la répartition par taille des NP immergées ont été observés, par rapport à un milieu riche en tampon phosphate de contrôle [33]. La diminution de la concentration en DPPC a lieu de façon dépendante de la surface et de la taille des NP. Cela signifie que la surface d'adsorption est responsable de l'agglomération et de la réduction de la concentration en phospholipides. La survenue de tels phénomènes dans le surfactant alvéolaire, dont la composition comprend des phospholipides importants dans le maintien des propriétés mécaniques du poumon, pourrait être un mécanisme comptant dans la survenue des effets toxiques des nanomatériaux dans l'appareil respiratoire.

2.6. Traitements de surface des nanoparticules

Le revêtement de surface est un paramètre important et probablement plus pertinent que le type de particules pour évaluer l'exposition chez l'Homme. Le revêtement de surface peut accentuer ou diminuer la toxicité de la particule. Derfus et son équipe ont montré que les puits quantiques (en anglais « quantum dots »), objets à une dimension de taille nanométrique, de cadmium-sélénium (Cd-Se) sont cytotoxiques pour des hépatocytes primaires sous certaines conditions [34]. En particulier, ils ont montré que la cytotoxicité des boîtes quantiques, objets à trois dimensions de taille nanométrique est modulée par certains paramètres du processus de synthèse, notamment l'exposition à des rayonnements ultraviolets et la surface de revêtement. La cytotoxicité observée est

corrélée à la libération d'ions Cd^{2+} libres due à la détérioration de la structure Cd-Se. Toutefois, lorsque les puits quantiques de Cd-Se sont convenablement traités, ils ne sont plus cytotoxiques. Ils sont actuellement utilisés dans le domaine de la recherche biomédicale dans le suivi de la migration et la réorganisation cellulaire *in vitro*.

Le revêtement de surface peut également moduler la pénétration des NP dans la cellule. L'albumine, protéine la plus abondante dans le plasma et dans le milieu interstitiel, semble faciliter l'endocytose des nanomatériaux. De même, la lécithine, phospholipide membranaire, semble faciliter la translocation à travers la barrière alvéolo-capillaire de particules de polystyrène (240 nm) recouvertes par de la lécithine, alors que les mêmes particules non recouvertes ne sont pas susceptibles de la traverser [35]. Des études expérimentales de Heckel et coll. [36] chez des rongeurs exposés par voie intraveineuse à des NP d'or revêtues d'albumine montrent une transcytose médiée par des récepteurs (protéines de liaison à l'albumine) *via* les caveolae. La présence de l'albumine et des phospholipides dans le revêtement liquidien des cellules épithéliales alvéolaires pourrait, par conséquent, être un élément important pour faciliter l'absorption épithéliale des nanomatériaux après déposition dans l'espace alvéolaire.

3. Inhalation, pénétration et déposition des nanoparticules dans l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire constitue la principale voie d'entrée dans l'organisme des particules. De façon générale, la pénétration et la déposition des particules inhalées dans l'appareil respiratoire sont soumises à cinq types de mouvements selon leur granulométrie. Il s'agit de la sédimentation par gravité, l'impaction inertielle, l'interception

(contact particules-surface), la diffusion et l'attraction électrostatique. Trois autres éléments importants affectent la déposition des particules dans l'appareil respiratoire : la géométrie des voies aériennes et leur ramification, la fréquence respiratoire et le mode respiratoire nasal ou buccal.

La déposition de NP inhalées sur les parois de l'appareil respiratoire est déterminée principalement par des mouvements de diffusion dus aux mouvements thermiques des molécules d'air inhalées et exhalées au contact des NP inhalées. Il est important de noter que les NP peuvent former des agrégats et/ou des agglomérats et passer ainsi d'une dimension nanométrique à une dimension micrométrique. Contrairement aux particules de taille micrométrique, plus la taille des NP est petite, plus la déposition s'effectuera au niveau du nasopharynx et au niveau de l'arbre trachéobronchique [17,37-42]. Des modèles mathématiques de prédiction de déposition des particules dans l'appareil respiratoire chez l'Homme ont été développés. Ainsi, d'après le modèle de la Commission Internationale de Protection Radiobiologique (CIPR), des NP inhalées de tailles croissantes (1, 5 et 20 nm) auront une fraction calculée de déposition massique de l'aérosol ambiant avec un mode respiratoire nasal, respectivement d'environ 90 %, 30 % et 15 % dans la région nasopharyngée, d'environ 10 %, 30 % et 15 % dans la région trachéobronchique et d'environ 0 %, 30 % et 50 % dans la région alvéolaire. Si l'on considère la répartition de la déposition en fonction de la concentration surfacique pulmonaire des NP de 20 nm, la déposition dans la région alvéolaire sera 100 fois supérieure à celle de la région nasopharyngée et 10 fois supérieure à celle de la région trachéobronchique [40,41].

4. Devenir des nanoparticules dans l'appareil respiratoire

4.1. Rétention pulmonaire des nanoparticules dans l'appareil respiratoire

La rétention pulmonaire des NP dépend principalement de la taille de la particule et des capacités d'élimination. À concentration égale, la rétention pulmonaire des NP après inhalation est plus importante par rapport aux particules de même nature chimique et de taille plus élevée. En effet, une étude expérimentale d'inhalation chez le rat montre que la rétention pulmonaire de NP de TiO_2 de 20 nm est plus importante par rapport aux particules fines de TiO_2 de 250 nm, à concentrations égales [43]. La rétention pulmonaire des NP est d'autant plus importante que les patients sont atteints d'une pathologie obstructive, telle que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive [44,45].

4.2. Mécanismes d'élimination des nanoparticules dans l'appareil respiratoire

Deux processus permettent d'éliminer les particules déposées dans le système respiratoire : les mécanismes d'élimination physique, différents dans les trois régions du système respiratoire, et les mécanismes d'élimination chimique des particules plus ou moins solubles, identiques dans toutes les régions.

Les mécanismes d'élimination physique des NP inhalées comprennent la clairance mucociliaire des cellules épithéliales ciliées en direction du carrefour aérodigestif, la phagocytose macrophagique et la translocation épithéliale. Cette dernière sera abordée plus loin.

La clairance pulmonaire mucociliaire concerne les étages trachéobronchique et nasopharyngé. Celle-ci est rapide, inférieure à 24 à 48 heures comme le montre une étude expérimentale chez des rats exposés par voie intratrachéale pendant une heure à des NP d'Iridium radiomarqué (15 et 80 nm) [46].

La phagocytose macrophagique des NP insolubles concerne les étages trachéobronchique et alvéolaire. Son efficacité est largement dépendante de la forme et de la taille des NP et de leurs agrégats. Les macrophages sont ensuite éliminés par l'ascenseur mucociliaire dans le tractus digestif avec une demi-vie particulièrement longue d'environ 700 jours chez l'Homme [40].

Les mécanismes d'élimination chimique des particules comprennent la dissolution uniquement pour les particules solubles, la lixiviation et la fixation protéique. Ainsi, les particules ou leurs composés peuvent être absorbés et diffusés ou fixés par des protéines ou d'autres structures subcellulaires et sont ensuite susceptibles d'être éliminés dans la circulation sanguine ou lymphatique.

Dans la région alvéolaire, le mécanisme d'élimination principal est la phagocytose des particules par les macrophages alvéolaires. La plupart des particules sont rapidement phagocytées en 6 à 12 heures avec de nettes différences selon la taille des particules. Plusieurs études expérimentales animales chez le rat ont montré que les NP non agglomérées sont moins bien éliminées par phagocytose macrophagique que les particules micrométriques avec une importante accumulation alvéolaire des NP [47,48]. Une étude expérimentale sur des macrophages alvéolaires humains obtenus à partir de liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) exposés à un aérosol d'une heure de NP de TiO_2 (20 nm) montre une accumulation croissante des NP dans les macrophages alvéolaires [49].

4.3. Translocation et distribution des nanoparticules dans l'organisme

Des études contradictoires ont été rapportées concernant la translocation de particules après l'inhalation de NP [50]. Certains auteurs suggèrent la possibilité d'une translocation épithéliale, interstitielle et neuronale des NP insolubles ou peu solubles vers d'autres compartiments de l'organisme [51-53].

Ce sont des mécanismes de translocation épithéliale et interstitielle qui permettraient aux NP de passer dans la circulation lymphatique et sanguine, conduisant ainsi les NP à une distribution à l'ensemble de l'organisme. L'endocytose des NP est un phénomène qui est particulièrement étudié dans différents types cellulaires. Des mécanismes d'endocytose épithéliale respiratoire concerneraient les trois compartiments de l'appareil respiratoire et permettraient un passage direct des NP dans le système sanguin ou lymphatique [17,52,53]. D'autres modes de transport des NP sont actuellement discutés, comme le transport vésiculaire luminal au niveau des caveolae présentes à la surface des cellules épithéliales et endothéliales. L'ouverture des caveolae s'étendant de 40 à 100 nm, elles semblent être une voie de passage à travers la barrière alvéolocapillaire vers la circulation systémique [38]. Plusieurs travaux ont évalué l'existence d'un passage systémique de différentes NP dans l'appareil respiratoire, après instillation intratrachéale ou après inhalation [38,53,54].

Chez l'animal, la translocation rapide au niveau pulmonaire de plusieurs types de NP vers la circulation sanguine a été observée dans plusieurs études [17,40,43,46,53,54]. Ce phénomène peut mener à la redistribution des NP dans les organes. Une étude expérimentale chez le rat a montré que les NP générées par chauffage de PTFE sont

détectées dans la sous-muqueuse bronchique et dans l'interstitium pulmonaire proche de la plèvre seulement 15 minutes après inhalation [55]. D'autres travaux expérimentaux chez le rat ont montré que seule une petite fraction de NP inhalées radiomarquées par de l'Iridium^{192} accèderait à la circulation systémique [46]. D'autres études expérimentales chez des rats exposés en chambre d'inhalation ont montré un marquage radioactif important au niveau hépatique et pulmonaire dès 30 minutes après l'inhalation de NP insolubles de C^{13} (20-29 nm) après 18 et 24 heures d'exposition [53]. Ceci implique un passage systémique des nanoparticules inhalées. En revanche, aucun marquage n'était retrouvé dans le cœur, le bulbe olfactif, le cerveau ou les reins après 24 heures d'exposition. Les différences observées pourraient être attribuées à la différence de mode d'administration et aux nanomatériaux utilisés. Dans une étude par inhalation chez le rat de NP de TiO_2 (20 nm) et de particules fines de TiO_2 (250 nm), les auteurs retrouvent dans les ganglions lymphatiques un plus grand nombre de NP, phénomène indiquant la pénétration des NP dans les espaces interstitiels [43]. Cependant, Kreyling et coll. ont observé, chez le rat, une translocation sanguine inférieure à 1 % de NP d'Iridium radiomarqué (15 et 20 nm) atteignant le foie, la rate, les reins, le cerveau et le cœur [46]. Nemmar et son équipe ont ainsi administré par voie intratrachéale à des hamsters des NP colloïdales d'albumine sérique dénaturée marquées au technétium 99 (Tc^{99m}) (< 80 nm) [54]. Dès 5 minutes après l'administration, en plus d'une dose massive retrouvée dans les poumons, on retrouve des traces de radioactivité dans le sang, de même que de très faibles quantités dans les reins, la rate et le cerveau des animaux. L'importance de translocation semble être variable en fonction des propriétés physicochimiques des NP [56]. En effet, Nemmar et coll. ont montré dans leur modèle de hamster que des paramètres physicochimiques,

tels que la charge polaire à la surface des NP, ont une grande influence sur l'importance de la translocation à travers l'épithélium respiratoire vers la circulation sanguine [54].

Chez l'Homme, la translocation des NP dans le compartiment sanguin est davantage contestée. Une étude expérimentale chez l'Homme semble montrer que les NP auraient la capacité de franchir facilement la barrière alvéolocapillaire et de passer ainsi dans la circulation sanguine pulmonaire. En effet, l'inhalation chez 5 sujets humains de NP de carbone de 5 à 10 nm radiomarquées au Tc^{99m} montre qu'il existerait un passage rapide de 3 à 5 % des NP à travers la barrière alvéolo-capillaire vers la circulation pulmonaire et systémique pour atteindre d'autres organes (foie, cœur, rate, cerveau) [57]. En revanche, deux autres études chez l'Homme n'ont pas retrouvé de translocation, après inhalation des NP de carbone radiomarquées au Tc^{99m} avec un seuil de détection de radioactivité des NP inhalées de 1 % [39,58]. Il reste que l'on peut s'attendre à un passage dans l'organisme des nanomatériaux entrant par la voie pulmonaire et donc à une distribution potentielle de ces NP aux différents organes.

Certains auteurs suggèrent une translocation neuronale des NP. Une étude expérimentale chez des rats exposés en chambre d'inhalation à des NP insolubles de C^{13} a observé à J1, après une exposition de 6 heures, une distribution des NP dans le cerveau, le cervelet et le bulbe olfactif avec une persistance jusqu'à J7 dans le bulbe olfactif [59]. Il existe, selon les auteurs, deux hypothèses : une translocation pulmonaire vers la circulation systémique avec un passage à travers la barrière hémato-encéphalique et une translocation neuronale via le bulbe olfactif, suivie d'une migration axonale rétrograde vers le système nerveux central. La translocation neuronale vers le système nerveux central *via* les neurones sensitifs de l'épithélium respiratoire serait possible dans les régions nasopharyngée et trachéobronchique. D'autres études chez

l'animal vont dans ce sens [21,40,60]. Toutefois, il convient de souligner que la muqueuse olfactive chez l'Homme représente seulement 5 % de la surface de la muqueuse nasale, alors que celle-ci est 10 fois plus importante chez le rat.

5. Effets des nanoparticules sur l'appareil respiratoire

Du fait du faible nombre d'études, de l'avènement récent des NP, de la grande variabilité des NP testées et des concentrations de NP utilisées *in vitro* généralement plus élevées à celles rencontrées *in vivo*, l'interprétation des études expérimentales sur les effets des NP doit rester très prudente. Dans ce chapitre, seront plus particulièrement abordés les effets respiratoires de deux types de nanomatériaux manufacturés : les CNT et des NP métalliques avec plus particulièrement des NP de TiO_2.

5.1. Etudes expérimentales *in vitro*

5.1.1. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant

- Nanotubes de carbone

Le stress oxydant est un des principaux mécanismes de cytotoxicité des nanomatériaux. Dans le cas des CNT, il est admis, de façon consensuelle, que seule la forme non purifiée des CNT contient du fer, inducteur de stress oxydant. Il s'agit là d'un point important à considérer pour le potentiel toxique des SWCNT. Les SWCNT riches en fer ont plus de propriétés oxydatives que la forme purifiée de SWCNT pauvres en fer [61].

Plus récemment, il a été montré qu'après incubation de cellules avec des SWCNT, le stress oxydant induit secondairement une diminution des défenses antioxydantes, car les auteurs ont trouvé des niveaux diminués de glutathion et d'enzymes antioxydantes (superoxyde dismutases 1 et 2) [62]. Cette intéressante constatation complète le mécanisme décrit plus haut.

- Nanoparticules métalliques

La capacité des nanomatériaux métalliques à produire des espèces réactives de l'oxygène en solution en condition abiotique a été démontrée pour des NP de TiO_2 sous des rayonnements ultraviolets [19]. La capacité de différents nanomatériaux métalliques et non métalliques à produire du stress oxydant intracellulaire a été montrée dans différents modèles [63-65]. Une étude récente a souligné le rôle de la taille dans les effets pro-oxydants et pro-inflammatoires de NP métalliques [66]. Les auteurs ont observé *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines A549, une réponse pro-inflammatoire et un stress oxydant induits par des NP de TiO_2 et de noir de carbone plus importants comparés à des particules de plus grandes tailles de même composition chimique à masse égale. Ce résultat suggère que la dose mesurée en surface particulaire totale par rapport à la surface cellulaire totale exposée est plus fiable que la dose mesurée en masse. Les relations dose-réponse observées *in vitro* dans cette étude semblent être directement comparables avec les relations dose-réponse trouvées dans les études *in vivo*, lorsque les doses ont été standardisées.

Plusieurs études désignent le stress oxydant comme un des mécanismes en cause dans les effets cytotoxiques des NP [19]. Une étude illustre élégamment ce propos. Elle compare les effets cytotoxiques de différents nanomatériaux en les corrélant avec leurs propriétés oxydatives intracellulaires, résultant du stress oxydant [23]. Elle montre clairement que le stress oxydant est toujours associé à une cytotoxicité des NP et est absent lorsque les NP ne sont pas cytotoxiques. La capacité d'une NP déterminée à produire des espèces réactives de l'oxygène en solution, sans contact cellulaire, n'était pas prédictive du potentiel cytotoxique de ces NP dans cette étude.

5.1.2. Dommage à l'ADN

- Nanotubes de carbone

Deux études publiées récemment montrent que des dommages à l'ADN apparaissent après incubation de cellules différenciées et non différenciées avec des CNT, avec respectivement des lignées cellulaires de fibroblastes V79 d'hamsters [67] et des cellules souches embryonnaires murines [68]. Ces études sont les premières à rapporter un tel phénomène. Elles montrent des altérations génétiques apparaissant dans les cellules souches murines, ce qui est cohérent avec la forte sensibilité des cellules souches soumises à des agents causant des dommages à l'ADN. En outre, bien que dans l'étude sur les cellules souches murines, des MWCNT soient présents dans les noyaux de cellules, les deux études mentionnées n'examinent pas en détail si les dommages à l'ADN sont associés ou non à la localisation nucléaire des CNT. Bien que les dommages à l'ADN des CNT doivent être confirmés et caractérisés par d'autres

études, ces deux articles indiquent que les dommages à l'ADN sont à prendre en compte lors de l'évaluation des effets des CNT.

- Nanoparticules métalliques

Les dommages à l'ADN causés par des particules métalliques et non métalliques faiblement hydrosolubles ont été également montrés. Une revue de la littérature sur la génotoxicité des particules faiblement hydrosolubles, comme le TiO_2, met en lumière les mécanismes en jeu [69]. Les auteurs concluent qu'à l'heure actuelle, les données disponibles dans la littérature indiquent seulement que l'exposition à des particules peu hydrosolubles entraîne une génotoxicité secondaire à l'oxydation de l'ADN par des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ils affirment que des recherches plus poussées sont nécessaires de façon urgente. En effet, d'une part, la causalité entre l'inflammation pulmonaire et la génotoxicité n'a pas encore été établie, et d'autre part, les effets de l'inflammation sur les dommages à l'ADN entraînant des effets mutagènes et cancérogènes (arrêt du cycle cellulaire, réparation de l'ADN, prolifération et apoptose) sont actuellement mal compris.

5.2. Études expérimentales *in vivo*

- Nanotubes de carbone

Lam et coll. [70] ont été une des premières équipes à investiguer les effets pulmonaires de l'instillation intratrachéale d'une suspension de CNT. Lam et coll. ont instillé des souris avec des SWCNT purs ou traités pour enlever leurs résidus métalliques, du noir de carbone ou encore des particules nanométriques de quartz. Quatre-vingt-dix jours après l'instillation, l'analyse histologique des poumons montre la présence des différents nanomatériaux au niveau des alvéoles. La présence des SWCNT (avec ou sans résidus métalliques) induit une réaction inflammatoire, avec la formation de granulomes, entourant les SWCNT, ce qui constitue un signe de toxicité [71]. Une formation similaire de granulomes a été observée chez des rats instillés par voie intratrachéale avec des SWCNT mais, ici, l'inflammation disparaît après 3 mois [72].

Des études ultérieures ont montré que cette réponse est observée plutôt quand les CNT sont mal dispersés et forment des agrégats de taille micrométrique. En effet, Mercer et coll. ont montré que des SWCNT bien dispersés et instillés par voie intratrachéale, génèrent une réponse fibrosante alvéolo-interstitielle, alors qu'une réaction granulomateuse a été observée après instillation de SWCNT moins bien dispersés [72]. Ces résultats ont été confirmés par deux études très récentes effectuées chez des souris exposées à des MWCNT en aérosol (6 heures par jour pendant 24 jours). Il s'agit des deux premières études évaluant les effets des CNT par inhalation [73,74]. Les auteurs rapportent des lésions pulmonaires absentes ou modérées (fibrose alvéolaire sans formation de granulomes).

En dépit de l'absence d'altérations pulmonaires, l'étude expérimentale de Mitchell et coll. décrit un état d'immunosuppression systémique observé après 7 ou 14 jours d'inhalation de MWCNT à 0,3, 1 et 5 mg/m^3 pendant 6 heures par jour avec une

réponse antigénique dépendante des lymphocytes T suppresseurs et une augmentation de l'expression de l'ARN messager et de la protéine interleukine IL-10 dans des homogénats de rate [73].

Une étude expérimentale chez des souris ApoE-/- exposées à des SWCNT par instillation intratrachéale unique, a rapporté des dommages à l'ADN mitochondrial et un stress oxydant au niveau de l'aorte à J7, J28 et J60. En outre, dans cette même étude, les auteurs montrent que des instillations intratrachéales répétées de SWCNT (une instillation par semaine pendant 8 semaines) accélèrent la formation de plaques athéromateuses chez les souris ApoE-/- exposées [75]. La réponse fibrotique pulmonaire à l'exposition aux CNT semble impliquer un stress oxydatif. En effet, cette réponse est exagérée chez des souris déficientes en une vitamine antioxydante, la vitamine E [76]. Enfin, une étude expérimentale récente de cette même équipe montre un autre effet systémique. Les auteurs ont observé que l'aspiration pharyngée de SWCNT aggrave de façon substantielle une infection pulmonaire à *Listeria monocytogenes*. En effet, il existe une diminution de la production de monoxyde d'azote (NO) et de la phagocytose des bactéries par les macrophages alvéolaires [77].

Une étude expérimentale récente a montré la survenue de cas de mésothéliome malin chez des souris transgéniques $p53^{+/-}$ exposées à des MWCNT ou à des fibres d'amiante crocidolite par voie intrapéritonéale en une instillation unique, avec respectivement 15,8 % (3/19) et 31,6 % (6/19) cas de mésothéliome, alors que les souris $p53^{+/-}$ exposées à des NP de fullerènes et les souris $p53^{+/-}$ non exposées n'ont pas développé de mésothéliome [78].

Une autre étude expérimentale a montré un effet « fibre » chez des souris exposées par voie intrapéritonéale à une instillation unique de 100 µg/ml, soit de fibres courtes ou longues d'amiante de type amosite, soit de MWCNT courts ou longs. Cette étude a montré un pouvoir inflammatoire et un nombre de granulome inflammatoire plus importants chez les animaux exposés aux fibres longues d'amosite ou aux MWCNT longs par rapport aux fibres d'amosite courtes ou aux MWCNT courts, respectivement [79].

- Nanoparticules métalliques

D'une façon générale, l'administration pulmonaire de NP de TiO_2 entraîne une réponse inflammatoire, caractérisée par l'augmentation de la cellularité totale du liquide de LBA, principalement en faveur des macrophages et aussi des polynucléaires neutrophiles [49,80-83]. Cette inflammation est souvent décrite comme transitoire, apparaissant 24 heures après l'administration (qu'elle soit par voie inhalée ou intratrachéale) et disparaissant le plus souvent avant 2 semaines [49,81]. Comme évoqué précédemment, différents paramètres physicochimiques semblent impliqués dans cette réponse, comme la dose, la taille, la structure cristalline. Ainsi, Grassian et coll. ont montré que des NP de TiO_2, de taille élémentaire 2 à 5 nm, administrées par voie inhalée chez des souris, entraînent une inflammation exagérée uniquement à la dose de 8,88 mg/m^3, alors que peu d'effet est observé pour des doses d'exposition plus faibles (0,77 ou 7,22 mg/m^3) [81]. Cet effet est observé jusqu'à deux semaines après l'exposition, mais n'est plus observable après 3 semaines. Certains travaux proposent la taille des NP comme étant

un paramètre important de leurs effets biologiques. Ainsi, seules des NP de TiO_2 (29 et 14 nm) ont un effet inflammatoire quand elles sont administrées par voie nasale chez la souris. Cet effet n'est pas observé avec des particules fines de TiO_2 (250 nm) [82]. De plus, dans cette étude, seules les ultrafines montrent un rôle adjuvant dans un modèle de sensibilisation allergique. Autre exemple, celui du TiO_2 anatase ultrafin (20 nm), instillé par voie intratrachéale à des rats et des souris, qui induit une réponse inflammatoire beaucoup plus importante (avec une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le liquide de LBA réalisé 24 heures après l'instillation) que lors de l'instillation de particules de TiO_2 fines d'anatase (250 nm) à masse égale. Il faut noter cependant que lorsque la dose administrée est exprimée en surface active, la réponse inflammatoire observée correspond à la même courbe dose-réponse pour les deux types de particules, ceci suggérant que le déterminant «surface active » est mieux adapté que la masse ou le nombre de particules pour déterminer un effet biologique [20]. Finalement, certaines études montrent que c'est la forme cristalline qui semble importer le plus. Comme le montre, par exemple, l'étude expérimentale de Warheit et coll. menée chez le rat [80]. Les auteurs ont instillé par voie intratrachéale des particules de TiO_2 rutile fin et ultrafin ou un mélange anatase/rutile (80/20) ultrafin. Quelle que soit la taille des particules de TiO_2, la forme cristalline rutile est associée à une inflammation transitoire, alors que le mélange anatase/rutile entraîne des effets pulmonaires non transitoires, encore présents 3 mois après l'exposition.

Un effet prothrombotique a été récemment démontré chez des rats exposés par instillation intratrachéale de NP de TiO_2 rutile à 1 et 5 mg/kg [84]. En effet, 24 heures après l'administration de NP de TiO_2, non seulement une augmentation du nombre de

macrophages alvéolaires et de polynucléaires neutrophiles dans le liquide de LBA a été observée, mais aussi un œdème pulmonaire et cardiaque, s'accompagnant d'une inflammation systémique avec une augmentation des monocytes et des granulocytes associée à une agrégation plaquettaire.

Enfin, un phénotype emphysémateux a été décrit chez des souris ICR exposées à des NP de TiO_2 (19-21 nm), après seulement deux semaines [83]. En effet, il existait à l'examen anatomo-pathologique, une destruction des septums alvéolaires, une hyperplasie des pneumocytes de type II, une apoptose des cellules épithéliales et une inflammation caractérisée par une augmentation du nombre de macrophages. C'est la première fois qu'un tel phénotype est décrit. Il est intéressant de noter l'antagonisme par rapport aux propriétés plutôt profibrosantes décrites pour les particules de TiO_2 de dimension micrométrique.

Conclusions

L'ensemble des études expérimentales *in vivo* et *in vitro* actuellement disponibles met en évidence l'existence d'effets biologiques des nanoparticules (nanotubes de carbone, TiO_2) sur l'appareil respiratoire avec, notamment, la génération de stress oxydant, un effet pro-inflammatoire, un effet pro-thrombotique, la possibilité de survenue de fibrose pulmonaire, d'emphysème pulmonaire ou de dommages à l'ADN. Cependant, peu de données scientifiques sont actuellement disponibles dans la littérature. Face à la recrudescence de l'utilisation des nanoparticules dans des applications, notamment industrielles et médicales, et à la fabrication des nanomatériaux en quantités

industrielles, il semble donc urgent d'approfondir nos connaissances sur les effets potentiels ou avérés des nanoparticules sur la santé afin de mieux comprendre les mécanismes toxicologiques mis en jeu. Une meilleure connaissance des effets biologiques potentiels des nanoparticules est requise, afin de mettre en place des mesures de prévention appropriées en milieu de travail et/ou en population générale, si cela s'avérait nécessaire.

Références

1. Somasundaran P, Chakraborty S, Qiang Q, Deo P, Wang J, Zhang R. Surfactants, polymers and their nanoparticles for personal care applications. *J Cosmet Sci* 2004 ; 55 Suppl : S1-17.

2. Cross SE, Innes B, Roberts MS, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol Physiol* 2007 ; 20 : 148-54.

3. Chen W, Zhang JZ, Joly AG. Optical properties and potential applications of doped semiconductor nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2004 ; 4 : 919-47.

4. Murphy CJ, Sau TK, Gole AM, Orendorff CJ, Gao J, Gou L, Hunyadi SE, Li T. Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *J Phys Chem B* 2005 ; 109 : 13857-70.

5. Nair LS, Laurencin CT. Nanofibers and nanoparticles for orthopaedic surgery applications. *J Bone Joint Surg Am* 2008 ; 90 Suppl 1 : 128-31.

6. le Masne de Chermont Q, Chanéac C, Seguin J, Pellé F, Maîtrejean S, Jolivet JP, Gourier D, Bessodes M, Scherman D. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ; 104 : 9266-71.

7. Service R. Nanotechnology grows up. *Science* 2004 ; 304 : 1732-4.

8. Roco M, Bainbridge WS, 2001. *Societal implications of nanoscience and nanotechnology,* NSET workshop report. National Science Foundation, Arlington, Virg. NSET, 272 p.

9. Sorensen M, Autrup H, Moller P, *et al.* Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* 2003 ; 544 : 255-71.

10. Künzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, Herry M, Horak F Jr, Puybonnieux-Texier V, Quenel P, Schneider J, Seethaler R, Vergnaud JC, Sommer H. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet* 2000 ; 356 : 795-801.

11. Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 155 : 1376-83.

12. Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002 ; 287 : 1132-41.

13. Timonen KL, Vanninen E, de Hartog J, Ibald-Mulli A, Brunekreef B, Gold DR, Heinrich J, Hoek G, Lanki T, Peters A, Tarkiainen T, Tiittanen P, Kreyling W, Pekkanen J. Effects of ultrafine and fine particulate and gaseous air pollution on cardiac autonomic control in subjects with coronary artery disease: the ULTRA study. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2006 ; 16 : 332-41.

14. de Hartog JJ, Hoek G, Peters A, Timonen KL, Ibald-Mulli A, Brunekreef B, Heinrich J, Tiittanen P, van Wijnen JH, Kreyling W, Kulmala M, Pekkanen J. Effects of fine and ultrafine particles on cardiorespiratory symptoms in elderly subjects with coronary heart disease: the ULTRA study. *Am J Epidemiol* 2003 ; 157 : 613-23.

15. Pekkanen J, Timonen KL, Ruuskanen J, Reponen A, Mirme A. Effects of ultrafine and fine particles in urban air on peak expiratory flow among children with asthmatic symptoms. *Environ Res* 1997 ; 74 : 24-33.

16. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991 ; 354 : 56-8.

17. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotechnology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 823-39.

18. Lanone S, Boczkowski J. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Curr Mol Med* 2006 ; 6 : 651-63.

19. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006 ; 311 : 622-7.

20. Oberdörster G, Ferin, J Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. Environ Health Perspect 1994 ; 102 Suppl 5 : 173-9.

21. IARC. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Man-made vitreous fibres*. IARC, Lyon, France, 2002 ; 81 : 418 pages.

22. Stanton MF, Laynard M, Tegeris A, Miller E, May M, Kent E. Carcinogenicity of fibrous glass: pleural response in the rat in relation to fiber dimension. *J Natl Cancer Inst* 1977 ; 58 : 587-603.

23. Watanabe M, Okada M, Kudo Y, Tonori Y, Niitsuya M, Sato T, Aizawa Y, Kotani M. Differences in the effects of fibrous and particulate titanium dioxide on alveolar macrophages of Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A* 2002 ; 65 : 1047-60.

24. Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 1992 ; 97 : 193-9.

25. Hohr D, Steinfartz Y, Schins RP, *et al.* The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO2 in the rat. *Int J Hyg Environ Health* 2002 ; 205 : 239-44.

26. Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. *Occup Environ Med* 2001 ; 58 : 211-6.

27. Park S, Nam H, Chung N, Park JD, Lim Y. The role of iron in reactive oxygen species generation from diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro* 2006 ; 20 : 851-7.

28. Bachoual R, Boczkowski J, Goven D, Amara N, Tabet L, On D, Leçon-Malas V, Aubier M, Lanone S. Biological effects of particles from the paris subway system. Chem Res Toxicol 2007; 20 : 1426-33.

29. Ball BR, Smith KR, Veranth JM, Aust AE. Bioavailability of iron from coal fly ash: mechanisms of mobilization and of biological effects. *Inhal Toxicol* 2000 ; 12 Suppl 4, 209-25.

30. Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A* 2003 ; 66 : 1909-26.

31. Patnaik A. Structure and dynamics in self-organized C60 fullerenes. *J Nanosci Nanotechnol* 2007 ; 7 : 1111-50.

32. Wang B, Feng WY, Wang TC, Jia G, Wang M, Shi JW, Zhang F, Zhao YL, Chai ZF. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol Lett* 2006 ; 161 : 115-23.

33. Kendall M, Brown L, Trought K. Molecular adsorption at particle surfaces: a PM toxicity mediation mechanism. *Inhal Toxicol* 2004 ; 16 Suppl 1 : 99-105.

34. Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett* 2004 ; 4 : 11-8.

35. Kato T, Yashiro T, Murata Y, Herbert DC, Oshikawa K, Bando M, Ohno S, Sugiyama Y. Evidence that exogenous substances can be phagocytized by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries. *Cell Tissue Res* 2003 ; 311 : 47-51.

36. Heckel K, Kiefmann R, Dorger M, Stoeckelhuber M, Goetz AE. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004 ; 287 : 867-78.

37. Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal Toxicol* 2003 ; 15 : 539-52.

38. Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Möller W, Behnke-Semmler M, Jennen L, Walch A, Michalke B, Schramel P, Heyder J, Schulz H. Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* 2006 ; 18 : 733-40.

39. Brown JS, Zeman KL, Bennett WD. Ultrafine Particle Deposition and Clearance in the Healthy and Obstructed Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 ; 166 : 1240-7.

40. Oberdörster G. Inhaled Nano-sized Particles: Potential effects and Mechanisms. Report of the First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials, 12 au 14 octobre 2004, Buxton, Grande-Bretagne, p 35-46. Ed Health and Safety Executive-National Institute for Occupational Safety and Health. (http://www.hsl.gov.uk/capabilities/nanosymrep_final.pdf).

41. Witschger O, Fabries JF. Particules ultrafines et santé au travail: Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. Hygiène et sécurité du travail. Cahiers de notes documentaires. *INRS* 2005 ;199 : 21-35.

42. Witschger O, Fabries JF. Particules ultrafines et santé au travail: Sources et caractérisation de l'exposition. Hygiène et sécurité du travail. Cahiers de notes documentaires. *INRS* 2005 ;199 : 37-54.

43. Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder AC. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* 2000 ; 96 : 5-74.

44. Pietropaoli AP, Frampton MW, Hyde RW, Morrow PE, Oberdörster G, Cox C, Speers DM, Frasier LM, Chalupa DC, Huang LS, Utell MJ. Pulmonary function, diffusing capacity, and inflammation in healthy and asthmatic subjects exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol* 2004 ; 16 Suppl 1 : 59-72.

45. Kim CS, Kang TC. Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 155 : 899-905.

46. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health* 2002 ; 65 : 1513-30.

47. Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophages. *Biomaterials* 1988 ; 9 : 356-62.

48. Green TR, Fisher J, Stone MH, Wroblewski BM, Ingham E. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokins by macrophages in vitro. *Biomaterials* 1998 ; 19 : 2297-302.

49. Geiser M, Casaulta M, Kupferschmid B, Schulz H, Semmler-Behnke M, Kreyling W. The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008 ; 38 : 371-6.

50. Borm PJ, Kreyling W, 2004. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles, potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 2004 ; 4 : 521-31.

51. Semmler-Behnke M, Takenaka S, Fertsch S, Wenk A, Seitz J, Mayer P, Oberdörster G, Kreyling WG. Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 728-33.

52. Möller W, Felten K, Sommerer K, Scheuch G, Meyer G, Meyer P, Häussinger K, Kreyling WG. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 ; 177 : 426-32.

53. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health* 2002 ; 65: 1531-43.

54. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 ; 164 : 1665-8.

55. Johnston CJ, Finkelstein JN, Gelein R, Baggs R, Oberdörster G. Characterization of the early pulmonary inflammatory response associated with PTFE fume exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996 ; 140 : 154-63.

56. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Möller W. Ultrafine particle-lung interactions: does size matter ? *J Aerosol Med* 2006 ; 19 : 74-83.

57. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 2002 ; 105 : 411-4.

58. Mills NL, Amin N, Robinson SD, Anand A, Davies J, Patel D, de la Fuente JM, Cassee FR, Boon NA, Macnee W, Millar AM, Donaldson K, Newby DE. Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med* 2006 ; 173 : 426-31.

59. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004 ; 16 : 437-45.

60. Katz LC, Burkhalter A, Dreyer WJ. Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature* 1984 ; 310 : 498-500.

61. Sarkar S, Sharma C, Yog R, Periakaruppan A, Jejelowo O, Thomas R, Barrera EV, Rice-Ficht AC, Wilson BL, Ramesh GT. Analysis of stress responsive genes induced by single-walled carbon nanotubes in BJ Foreskin cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2007 ; 7 : 584-92.

62. Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, Barr J, Wise K, Thomas R, Wilson BL, Ramesh GT. Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2007 ; 7 : 2466-72.

63. Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinink A, Stark WJ. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol* 2007 ; 41 : 4158-63.

64. Wilson MR, Foucaud L, Barlow PG, Hutchison GR, Sales J, Simpson RJ, Stone V. Nanoparticle interactions with zinc and iron: implications for toxicology and inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007 ; 225 : 80-9.

65. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 2006 ; 6 : 1794-807.

66. Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med* 2007 ; 64 : 609-15.

67. Kisin ER, Murray AR, Keane MJ, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Wallace WE, Kagan VE, Shvedova AA. Single-walled carbon nanotubes:

geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A* 2007 ; 70 : 2071-9.

68. Zhu L, Chang DW, Dai L, Hong Y. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. *Nano Lett* 2007 ; 7 : 3592-7.

69. Schins RP, Knaapen AM. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal Toxicol* 2007 ; 19 Suppl 1 : 189-98.

70. Lam C, James JH, McCluskey R, Hunter R. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* 2004 ; 77 : 126-34.

71. Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* 2004 ; 77 : 117-25.

72. Mercer RR, Scabilloni J, Wang L, Kisin E, Murray AR, Schwegler-Berry D, Shvedova AA, Castranova V. 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* 2008 ; 294 : L87-97.

73. Mitchell LA, Gao J, Wal RV, Gigliotti A, Burchiel SW, McDonald JD. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci* 2007 ; 100 : 203-14.

74. Li JG, Li WX, Xu JY, Cai XQ, Liu RL, Li YJ, Zhao QF, Li QN. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ Toxicol* 2007 ; 22 : 415-21.

75. Li Z, Hulderman T, Salmen R, Chapman R, Leonard SS, Young SH, Shvedova A, Luster MI, Simeonova PP. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 377-82.

76. Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Young SH, Gao F, Tyurina YY, Oury TD, Kagan VE. Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007 ; 221 : 339-48.

77. Shvedova AA, Fabisiak JP, Kisin ER, Murray AR, Roberts JR, Tyurina YY, Antonini JM, Feng WH, Kommineni C, Reynolds J, Barchowsky A, Castranova V, Kagan VE. Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008 ; 38 : 579-90.

78. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci* 2008 ; 33 : 105-16.

79. Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W, Donaldson K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 2008 ; 3 : 423-8.

80. Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO2 particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007 ; 230 : 90-104.

81. Grassian VH, O'Shaughnessy P T, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, Thorne PS. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 397-402.

82. De Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clin Exp Allergy* 2006 ; 36 : 1469-79.

83. Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, Chen JJ, Yang PC. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J* 2006 ; 20 : 2393-5.

84. Nemmar A, Melghit K, Ali BH. The Acute Proinflammatory and Prothrombotic Effects of Pulmonary Exposure to Rutile TiO2 Nanorods in Rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008 ; 233 : 610-9.