

Un point sur l'écotoxicité et la toxicité cellulaire des nanotubes de carbone.

E. Flahaut, P. Landois, V. Datsyuk (1)

L. Bordenave, L. de Gabory, R. Bareille, M. Remy-Zolghadri, R. Daculsi, B. L'Azou (2)

B. Pipy, E. Meunier, M. Beraud, J. Bernad, D. Olagnier, L. Lefèvre, F. Coste (3)

L. Gauthier, F. Mouchet, F. Bourdiol, A. Perrault, E. Pinelli (4)

P. Puech (5)

(1) CIRIMAT/LCMIE UMR5085, Université Paul Sabatier – Toulouse 3, 31062 Toulouse cedex 9 ; flahaut@chimie.ups-tlse.fr

(2) INSERM U577, Université Victor Segalen – Bordeaux 2, 33076 Bordeaux cedex ; laurence.bordenave@biophys.u-bordeaux2.fr

(3) UMR MD3 EA2405, Université Paul Sabatier – Toulouse 3, 31432 Toulouse cedex 4 ; bernard.pipy@inserm.fr

(4) EcoLab UMR 5245, Campus INP-ENSAT, 31326 Auzeville-Tolosane ; lgauthie@cict.fr

(5) CEMES, 31055 Toulouse Cedex 4 ; pascal.puech@cemes.fr

1- Positionnement du sujet et objectifs

L'objectif du projet NTCTOX a concerné l'étude de l'impact sur la santé et sur l'environnement des nanotubes de carbone, en utilisant comme matériel d'étude les NTC biparois synthétisés et caractérisés au CIRIMAT. Le fait de disposer d'échantillons homogènes préparés et caractérisés directement au sein du consortium a permis de réaliser une étude comparative unique en son genre à la fois du potentiel toxique et écotoxique des NTC, tout en démontrant d'une part l'importance de la dispersion et de la fonctionnalisation des NTC et d'autre part les biais induits par le choix des tests de toxicité et le type de modèle cellulaire (immortelles ou non).

2- Matériels et méthodes

Il est recommandé de se rapporter aux articles correspondants pour les détails des protocoles expérimentaux qui varient beaucoup entre les expérimentations de fonctionnalisation et dispersion des NTC, études sur cultures cellulaires (cellules respiratoires, monocytes et macrophages), études *in vivo* sur amphibiens.

3- Principaux résultats scientifiques

A- Synthèse, fonctionnalisation, dispersion des NTC

Un des soucis majeurs lors des études de toxicité des NTC concerne la stabilité de leurs dispersions dans les milieux aqueux, en particulier les milieux de culture biologique. Une bonne dispersion permet d'assurer une exposition la plus homogène possible. Ceci est cependant très difficile à obtenir en l'absence d'ajout de tensioactif. L'ajout d'un tensioactif (dont la toxicité intrinsèque est à prendre en compte) n'est cependant pas sans conséquences sur la toxicité des NTC, et doit donc être limité à la concentration la plus faible possible. Une partie importante des études a été consacrée à la préparation de suspensions de NTC à l'aide de différents tensioactifs biocompatibles (notamment gomme arabique et carboxyméthylcellulose (CMC)), ainsi qu'à la mise au point de la substitution de tensioactifs toxiques par des non-toxiques afin d'améliorer à la fois la dispersion et la stabilité des suspensions, tout en limitant au minimum leur toxicité [P4]. Une autre méthode permettant de stabiliser les suspensions de NTC de façon très simple consiste à les fonctionnaliser, notamment par oxydation par l'acide nitrique. Ceci permet de préparer des suspensions indéfiniment stables, sans ajout de tensioactif. Cependant, cette fonctionnalisation n'est pas sans conséquences sur la charge de surface des NTC ainsi que sur la modification de leur caractère hydrophile / hydrophobe.

B- Interaction des DWNT avec les monocytes / macrophages

Les cibles cellulaires principales des matériaux particuliers comme l'amiante et la silice sont les monocytes et les macrophages qui participent activement à leur capture et à leur élimination avec pour conséquence l'initiation d'une réponse inflammatoire qui à terme augmente le risque de développer un cancer. Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact des DWNT sur la capacité des monocytes de sujets sains à induire ou non une réponse inflammatoire *in vitro*. Les résultats obtenus quand à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs lipidiques montrent que

l'effet des DWNT sur les fonctions des monocytes varie en fonction de l'état d'activation des monocytes. Ainsi, nous avons montré que les DWNT pouvaient déclencher une sécrétion des cytokines pro inflammatoires IL1 β et TNF- α en fonction du donneur de monocytes humains. La production de ces cytokines inflammatoires par les DWNT s'accompagne d'une induction de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et d'une diminution de l'expression membranaires du récepteur CD36 connu pour participer à la réponse anti-inflammatoire des monocytes/macrophages. Inversement, l'absence d'effet des DWNT sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL1 β et TNF- α par les monocytes de certains donneurs s'accompagne d'une absence de diminution du niveau d'expression du CD36. De manière générale nous avons établi que les DWNT déclenchent une production intracellulaire d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IROs).

Ces différences de production de cytokines inflammatoires par les DWNT, notamment de l'IL-1 β , selon l'origine des monocytes étudiés, nous ont amenés à émettre l'hypothèse que les DWNT pourraient agir sur la maturation post-transcriptionnelle de cytokines inflammatoires plutôt que sur la transcription de leur gène. En effet, il est connu que certaines cytokines comme l'IL-1 β sont produites sous forme de précurseurs (pro-cytokines) qui pour être sécrétées doivent être activées par un complexe protéique appelé inflammasome. Ainsi, la production de l'IL-1 β nécessite l'activation de l'inflammasome et la présence de la pro-IL-1 β intracellulaire ; celle-ci étant sous le contrôle de l'expression du gène de cette pro-cytokine. Ces deux événements pouvant être régulés de manière indépendante. Notre objectif a donc été de déterminer si les DWNT pouvaient *in vitro*, activer l'inflammasome des monocytes humains de sujet sains sans activer l'expression du gène de la pro-IL-1 β .

Les études entreprises au laboratoire confirment cette hypothèse, elles montrent, *in vitro*, l'activation spécifique de l'inflammasome par les DWNT dans les monocytes humains sans induction du gène de la pro-IL-1 β . Cette activation mise en évidence par le clivage de la caspase-1 implique la phagocytose des DWNT, l'acidification du phagosome, l'activation des cathepsines du phago-lysosome et un efflux de potassium. Ainsi par leur capacité à activer l'inflammasome les DWNT pourraient contribuer à déclencher et à amplifier une réponse inflammatoire lorsque les cellules ont accumulées de la pro-IL-1 β et sont donc pré-activées. Ainsi, la libération par les DWNT de l'IL-1 β par des monocytes pré-inflammatoires serait responsable de l'amplification d'une cascade inflammatoire caractérisée par la sécrétion de TNF- α et d'autres médiateurs inflammatoires. Ce travail qui montre pour la première fois que les DWNT agissent sur les monocytes humains de sang périphérique via l'activation de l'inflammasome va très prochainement être soumis pour publication.

C- Toxicité des DWNT vis-à-vis de cellules respiratoires

L'une des fonctions du nez est de débarrasser l'air inspiré d'une grande partie des particules aéroportées avant l'arrivée dans les poumons. L'efficacité de cette filtration dépend essentiellement du débit respiratoire et de la taille des particules. Avec l'arrivée des nanoparticules, une nouvelle problématique se pose. L'échelle nanométrique leur confère des propriétés volatiles particulières tout autant que des propriétés physico-chimiques originales alors qu'elles sont composées d'une matière finalement connue depuis longtemps (par exemple le carbone). La quantité de nanoparticules qui se déposent dans les cavités nasales augmente avec la diminution du diamètre des particules, le ralentissement du débit respiratoire et leur répartition se fait sur l'ensemble de la muqueuse nasale soit, tout à fait l'inverse de ce qui se passe pour les microparticules. Le nez est donc au premier plan des organes concernés par les nanoparticules et représente une porte d'entrée potentielle pour leur pénétration dans l'organisme. Jusqu'aux travaux de l'unité INSERM 577 peu de données *in vitro* existaient sur l'effet potentiel des nanotubes de carbone dans les cavités nasales alors que beaucoup de données étaient disponibles sur l'interaction entre ces nanoparticules et le poumon.

Dans ce contexte l'unité INSERM 577 a évalué *in vitro* l'effet que pouvait avoir la présence de DWNT au contact de cellules épithéliales respiratoires nasales afin d'avoir une première idée sur le comportement de l'épithélium de revêtement au contact de ces nanoparticules. Pour être au plus proche de la réalité, nous avons évalué la cytotoxicité des DWNT sur des cellules humaines normales plutôt que de choisir des cellules issues de cancer ou des cellules animales, habituellement utilisées pour ce genre d'études. Ces cellules ont été exposées à des concentrations croissantes de DWNT (de 0,5 à 50 mg/L) pendant 12 jours consécutifs. Afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux d'autres études et avec ceux obtenus avec les cellules nasales, d'autres cellules épithéliales respiratoires, issues cette fois-ci de cancer du poumon humain (A549), ont été utilisées. Nous avons étudié pour ces deux types cellulaires la viabilité et l'activité métabolique des cellules. Puis pour les cellules nasales nous avons évalué leur degré de différenciation, leur stress oxydatif, leurs caractéristiques morphologiques au contact des DWNT ainsi que le devenir de ces nanoparticules.

Ces travaux ont montré qu'il existe un ralentissement de la croissance des cellules nasales dépendant de la concentration en DWNT avec un effet cumulatif dans le temps au moins jusqu'au neuvième jour. Cet effet est plus ou moins marqué selon le test utilisé, illustrant le fait que les NTC eux-mêmes peuvent interagir avec les réactifs (adsorption) et ainsi modifier les résultats. Cette adsorption des réactifs colorés par les DWNT pour des concentrations entre 25 et 50 mg/L n'a pas permis de conclure pour ces concentrations. Cependant il semble exister tout de même une réelle toxicité

dans quasiment toutes les circonstances expérimentales, plus marquée avec les cellules normales qu'avec les cellules d'origine cancéreuse. Par ailleurs, contrairement à ce qui se passe lors de la cicatrisation de la muqueuse nasale où les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques de différenciation, ici, les mêmes cellules gardent toutes leurs caractéristiques de différenciation tant pour la cytokératine 7 et la glycoprotéine UEA-I que lors du dosage intracellulaire de la cytokératine 19. Certaines cellules meurent sans pour autant présenter de signes annonciateurs d'un processus de cicatrisation, plaçant au centre des discussions la problématique de reconnaissance par la cellule de ces composés artificiels. En revanche, la présence des DWNTs déclenche une production de mucus (bleu alcian) dès 0,5 mg/L alors qu'un stress oxydatif n'a été observé qu'à 25 mg/L (production excessive d'espèces réactives de l'oxygène). Si ces travaux n'ont pas permis de déterminer le seuil de toxicité, l'observation des cellules nasales en microscopie électronique a mis en évidence à la concentration de 25 mg/L des membranes cellulaires perforées sur des cellules atrophiques. Les DWNT ont été observés dans les cellules (pénétration intra-cytoplasmique), provoquant en cas de présence excessive, la mort cellulaire.

En conclusion, il semble exister dans le cadre de ces travaux une réelle toxicité des NTC sur les cellules de revêtement des cavités nasales. Cependant, elle ne doit pas être pour l'instant directement extrapolée à l'homme en raison notamment du manque d'effet du tapis muco-ciliaire présent *in vivo*, des concentrations utilisées probablement très supérieures à celle qui pourraient être rencontrées en pratique (travailleurs) et à l'impossibilité de déterminer les seuils de toxicité du fait des interférences entre les NTC et les réactifs colorés impliqués dans les tests mise en œuvre.

D- Impact environnemental des DWNT

L'étude a porté sur les impacts potentiels des NTC en milieu aquatique, dans la mesure où ce compartiment constitue le réceptacle ultime des contaminations quelque soit leur lieu d'émission. Ainsi, les outils mis en œuvre ont permis de pousser les investigations vis-à-vis d'organismes particulièrement sensibles à la qualité des milieux aquatiques que sont les amphibiens. L'application d'essais biologiques normalisés au niveau national et international (AFNOR, 2000 ; ISO 2006) a permis de comparer les effets potentiels liés aux expositions de ces organismes à différentes concentrations de DWNT et en fonction de leur état de surface (DWNT bruts ou oxydés par traitement à l'acide nitrique). Pour un type donné de DWNT, ceux-ci ont été étudiés bruts mais aussi dispersés dans le milieu d'exposition à l'aide de tensioactifs pour évaluer les variations biologiques éventuelles dues à un état de dispersion physique des DWNT. Les effets de toxicité aiguë (mortalité), chronique (croissance) et génétique ont principalement été étudiés chez les organismes modèles. En parallèle et dans certains cas, la spectroscopie Raman a été utilisée pour confirmer la présence des DWNT dans les organismes exposés.

Globalement, les premiers résultats obtenus montrent l'importance de disposer de protocoles spécifiques à l'étude de ces matériaux à l'échelle nanométrique ainsi que la grande diversité des réponses biologiques liée, entre autre, à l'état physico-chimique des nanoparticules étudiées.

Les premiers effets significatifs (mortalité et inhibition de croissance) sont observés chez les organismes exposés à partir de 10 mg/L. Des effets modulés sur la croissance sont observés chez les organismes exposés en présence de DWNT dispersés. Il semble que la toxicité observée puisse s'expliquer par des effets mécaniques (perturbation des échanges gazeux au niveau des branchies, perturbation du transit intestinal et de la digestion), qui ne seraient pas forcément liés à des effets intrinsèques des DWNT (le franchissement de la barrière intestinale n'a par exemple pas été mis en évidence).

4- Principales publications et communications (issues directement ou dérivées des travaux) [>50]

Publications dans des revues internationales avec comité de lecture

[P1] F. Mouchet, P. Landois, E. Flahaut, E. Pinelli, L. Gauthier

Nanotoxicology, 1, (2), (2007), 149-156, "Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*"

[P2] F. Mouchet, P. Landois, E. Sarremejean, G. Bernard, P. Puech, E. Pinelli, E. Flahaut, L. Gauthier

Aquatic Toxicology, 87, (2), (2008), 127-137, "Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *xenopus laevis*"

[P3] C. Lamprecht, J. Danzberger, P. Lukanov, C. M. Tilmaciu, A. M. Galibert, B. Soula, E. Flahaut,

H. J. Gruber, P. Hinterdorfer, A. Ebner, F. Kienberger, Ultramicroscopy, 109, (8), (2009), 899-906, "AFM Imaging of Functionalized Double-Walled Carbon Nanotubes"

[P4] V. Datsyuk, P. Landois, J. Fitremann, A. Peigney, A. M. Galibert, B. Soula, E. Flahaut

J. Mater. Chem., 19, (2009), 2729-2736, "Double-Walled Carbon Nanotube dispersion via surfactant substitution"

[P5] F. Mouchet, P. Landois, V. Datsyuk, P. Puech, E. Pinelli, E. Flahaut, L. Gauthier

Env. Toxicology, 2009, DOI : 10.1002/tox.20537, "Use of the international amphibian micronucleus standardised procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes (DWNTs) toxicity and genotoxicity in water"

[P6] C. Lamprecht, I. Liashkovich, V. Neves, J. Danzberger, E. Heister, M. Rangl, H. M. Coley, J. McFadden, E. Flahaut, H. J. Gruber, P. Hinterdorfer, F. Kienberger and A. Ebner, *Nanotechnology*, 20, (37), (2009), 434001:1-7, "AFM imaging of functionalized carbon nanotubes on biological membranes"

[P7] K. W. Kwok, K. M. Leung, E. Flahaut, J. Cheng, S. H. Cheng

Nanomedicine, 5, (6), (2010), 951-961, "Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: Influence of different dispersion methods"

[P8] E. Flahaut

Nanomedicine, 5, (6), (2010), 949-590, Edito of the special focus issue on Environmental Toxicity of Nanoparticles (guest editor)

[P9] D. Crouzier, S. Follot, E. Gentilhomme, E. Flahaut, R. Arnaud, V. Dabouis, C. Castellarin, J.C. Debouzy

Toxicology, 272, (1-3), (2010), 39-45, "Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung"

[P10] P103- V. Neves, E. Heister, S. Costa, C. Tîlmaciu, E. Borowiak-Palen, C. Giusca, E. Flahaut, B. Soula,

H. M. Coley, J. McFadden, S. R. P. Silva

Adv. Funct. Mater., 20, (19), (2010), 3272–3279, "Uptake and Release of Double-Walled Carbon Nanotubes by Mammalian Cells"

[P11] J. C. Debouzy, D. Crouzier, E. Flahaut

Env. Toxicol. Pharmacology, 30, (2), (2010), 147-152, "Hydrophobic double walled carbon nanotubes interaction with phospholipidic model membranes: ¹H-, ²H-, ³¹P NMR and ESR study"

[P12] L. De Gabory, R. Bareille, R. Daculsi, B. L'Azou, E. Flahaut, L. Bordenave

Soumis à *Rhinology*, "Carbon nanotubes have a deleterious effect on the nose: the first *in vitro* data."

Publications dans des revues nationales avec comité de lecture

F. Mouchet, P. Landois, E. Flahaut, E. Pinelli, L. Gauthier

Environnement, Risques & Santé, 8, (1), (2009), 47-55, "Écotoxicité des nanotubes de carbone dans l'environnement : contexte et état de l'art"

Communications orales invitées à des conférences internationales

• E. Flahaut*, P. Landois, F. Mouchet, L. Gauthier, C. Salvador-Morales, R.B. Sim, B. Pipy, S.H. Cheng

GDR-E "Science and applications of Carbon Nanotubes", 2007 Annual Meeting, Autrans (France), 15-19 Octobre 2007

"Investigation of the toxicity and ecotoxicity of Double-walled Carbon nanotubes"

• E. Flahaut*, P. Landois, F. Mouchet, L. Gauthier, C. Salvador-Morales, R.B. Sim

VI Congress of the Venezuelan Physical Society, Mérida (Venezuela), 2-9 Mars 2008, "Investigation of the toxicity and environmental impact of double-walled carbon nanotubes"

• F. Mouchet, P. Landois, E. Pinelli, L. Gauthier*, E. Flahaut

1st Carbon nanotube Biology, Medicine and Toxicity Symposium, Satellite workshop of the Nanotube'08 international conference, Montpellier, 28 juin 2008, "What about the potential toxicity of Double -Walled Carbon Nanotubes (DWNT) in amphibian larvae?"

• E. Flahaut*, P. Landois, V. Datsyuk, F. Mouchet, L. Gauthier, A. Gales, M. Béraud, J. Bernad, G. Carrera, B. Pipy, P. Puech, L. de Gabory, R. Bareille, M. Rémy, J. C. Fricain, L. Bordenave

5th Nanoscience and Nanotechnology Conference, NanoTR5, Anadolu University, Eskisehir (Turquie), 8-12 juin 2009

"Investigation of the toxicity and environmental impact of Double-walled Carbon nanotubes"

• E. Flahaut

Escuela Franco-Venezolano de Nanotecnología (ENano 2009), Caracas – Choroní (Venezuela), 2-6 Nov. 2009

"Double-walled Carbon nanotubes: from the synthesis to the investigation of the potential toxicity and environmental impact"

• E. Flahaut*, L. De Gabory, L. Bordenave, E. Meunier, B. Pipy, F. Bourdiol, F. Mouchet, L. Gauthier

Congrès national de Chimie des Matériaux, Hôtel El Marsa Sidi Fredj, Alger (Algérie), 23-24 Nov. 2010, "Nanotubes de carbone biparois : applications biomédicales et questions de santé et d'environnement"

Communications orales invitées à des conférences nationales

• E. Flahaut

Journées Annuelles SF2M (Société Française de Métallurgie et de Matériaux), Séance des Lauréats, Saint-Etienne (France), 31 mai 2007, "Nanotubes de Carbone : Synthèse, nanocristaux 1D, et questions de toxicité et d'impact environnemental"

• E. Flahaut

"Atelier de formation aux Nanotechnologies", Nailloux, 15-19 Octobre 2007, "Nanotubes de Carbone : synthèse et questions de santé humaine et d'impact environnemental"

• E. Flahaut, L. Gauthier*

3ème Workshop de l'Institut des Technologies Avancées en Sciences du Vivant (ITAV), Toulouse, 25 Septembre 2008

"Nanotubes de carbone biparois, quelles interactions avec le vivant ?"

• P. Landois, F. Mouchet, V. Datsyuk, P. Puech, E. Pinelli, L. Gauthier, E. Flahaut

Programme Interdisciplinaire du CNRS, Chimie pour le Développement Durable (CPDD), Bilan & Perspectives, Colloque de synthèse, 3 - 4 Novembre 2009, Paris, France, "Synthèse, mise en suspension et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone"

• L. Gauthier, F. Mouchet, P. Puech, P. Landois, F. Bourdiol, E. Pinelli, E. Flahaut

"Chemstart'Up", Pau, 18-19 Mai 2010, "Nanotubes de carbone et écotoxicologie"

• E. Flahaut, L. De Gabory, L. Bordenave, E. Meunier, B. Pipy, F. Bourdiol, F. Mouchet, L. Gauthier

Matériaux 2010, Nantes, France, 18-22 Oct. 2010, "Nanotubes de carbone biparois : synthèse, applications, santé et environnement"

Autres (principales) communications orales à des conférences internationales

• J. Cheng*, E. Flahaut, S. H. Cheng

"Society of Environmental Toxicology and Chemistry 2006 meeting", Beijing (Chine), 18-20 Sept. 2006

"Effect of carbon nanotubes on developing Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos"

• F. Mouchet*, G. Bernard, L. Gauthier, E. Pinelli, E. Sarremejean, E. Flahaut, P. Landois

"NanoToxicity'07", Paris, 26-28 Juin 2007

"Ecotoxicological Impacts of DWNTs on Amphibian Larvae"

• P. Landois*, F. Mouchet, E. Flahaut, L. Gauthier

"Nanotube-08", 9th International Conference on the Science and Applications of Nanotubes,

29 juin – 4 juillet 2008, Montpellier, France, "Ecotoxicological impact of DWNT in water on amphibian larvae"

• E. Flahaut*, P. Landois, F. Mouchet, L. Gauthier, C. Salvador-Morales, R.B. Sim

"French-American Young Engineering Scientists Symposium, YESS'08", Ambassade de France aux USA, Office for Science and Technology, Washington (D.C.), 7-9 Juillet 2008, "Investigation of the toxicity and environmental impact of Double-walled Carbon nanotubes"

• P. Landois*, F. Mouchet, V. Datsyuk, E. Pinelli, P. Puech, E. Flahaut, L. Gauthier

"NanoRisk 2008", Paris (France), 21-23 Oct. 2008, "What about the potential toxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNT) in Amphibian larvae?"

• L. de Gabory*, R. Bareille, M. Rémy, J.C. Fricain, E. Flahaut, L. Bordenave

CARBON 2009, Biarritz, France, 14-19 juin 2009, "Cytotoxicity of double-walled carbon nanotubes (DWNT) on respiratory human cells"

• P. Landois, F. Mouchet, V. Datsyuk, P. Puech, E. Pinelli, L. Gauthier, E. Flahaut

ESF Research Conference, Nanocarbons: from physicochemical and biological properties to biomedical and environmental effects, Acquafredda di Maratea (Italie), 8 - 13 Sept. 2009, "Ecotoxicological effects of carbon nanotubes in amphibian larvae : (geno)toxicity evaluation according standardized assays"

• L. De Gabory, R. Bareille, M. Remy, V. Datsyuk, B. L'azou, R. Daculsi, J.C. Fricain, E. Flahaut, L. Bordenave

Biomaterials Congress ESB 2009. Lausanne (Suisse), 7-11 Septembre 2009, "Double-walled carbon nanotubes (DWCNT) have a deleterious effect on human airway epithelial cells in vitro"

• P. Landois, F. Mouchet, V. Datsyuk, P. Puech, E. Pinelli, L. Gauthier, E. Flahaut

ESF Research Conference, Nanocarbons: from physicochemical and biological properties to biomedical and environmental effects, Acquafredda di Maratea (Italie), 8 - 13 Sept. 2009, "Ecotoxicological effects of carbon nanotubes in amphibian larvae : (geno)toxicity evaluation according standardized assays"

• L. Gauthier*, F. Mouchet, P. Landois, E. Pinelli, E. Flahaut

"French-American Young Engineering Scientists Symposium, YESS'09", Paris (France), 16-18 Nov. 2009

"Carbon nanotubes ecotoxicity: preliminary assessment using amphibian larvae"

• S. Fiorito*, F. Andreola, E. Flahaut, R. Psaila, A. Serafino

Chem on Tubes 2010, Arcachon, France, 11-15 Avril 2010, "Anti-proliferative effects of DWCNTs on a colon adenocarcinoma cell line"

• E. Flahaut*, B. Pipy, L. De Gabory, L. Bordenave, F. Mouchet, L. Gauthier

"NT10 - 11th International conference on the science and application of nanotubes", Montréal (Canada), 27/06/2010 - 2/07/2010, "A comparative study of the potential impact of DWNT on human health and the environment"

• P. Landois*, F. Mouchet, P. Puech, L. Gauthier, E. Flahaut

"3rd Carbon Nanotube Biology Medicine and Toxicology (CNBMT) Satellite symposium", Montréal (Canada), 27/06/2010

"Comparative ecotoxicological study in water of double- and multiwalled carbon nanotubes"

Autres communications orales à des conférences nationales : 5

Séminaires invités en France et à l'étranger : 10

5- Conclusions et faits marquants

En ce qui concerne la santé humaine, l'interaction avec les monocytes et macrophages humains montre que ces derniers cherchent à éliminer les NTC, provoquant la libération de médiateurs de l'inflammation. Ceci constitue pour ces cellules une réponse normale en présence d'un corps étranger, et n'est donc pas spécifique à la présence des NTC.

Des cellules respiratoires ont également été testées en culture (cellules nasales et pulmonaires). Deux types ont été utilisés : soit des cellules cancéreuses, généralement utilisées par les chercheurs pour leur facilité de mise en culture, soit des cellules dites « primaires », beaucoup plus proches de la réalité d'un organe normal. Toutes ces cellules subissent une agression par les NTC (dont l'intensité dépend de la dose) mais les cellules cancéreuses ont montré une plus grande résistance. Les NTC semblent pénétrer dans les cellules, au moins dans le cytoplasme, sans que les mécanismes aient pu être élucidés. Les traitements chimiques de purification des NTC, couramment employés au niveau industriel pour traiter les produits bruts de synthèse avant commercialisation, améliorent très nettement leur dispersion dans l'eau et facilitent donc leur interaction avec le vivant. Ceci se traduit dans tous les cas par une toxicité plus marquée. Il n'y a pas encore de preuves définitives mais tout laisse à penser que cet effet est lié principalement à la meilleure dispersion des nanotubes.

En ce qui concerne l'impact environnemental, des études ont été réalisées à l'aide d'un modèle amphibien particulièrement pertinent vis-à-vis du milieu aquatique. Les premiers effets significatifs (retard de croissance) sont observés à partir d'une quantité de nanotubes de carbone (NTC) supérieure ou égale à 10mg/L. Cette concentration est très élevée et ne pourrait correspondre qu'à une situation accidentelle de contamination. Aucun signe de génotoxicité (altérations génétiques) n'a pu être montré dans les conditions des essais. Il semble que la toxicité observée puisse s'expliquer par des effets mécaniques (perturbation des échanges gazeux au niveau des branchies, perturbation du transit intestinal et de la digestion), qui ne seraient pas forcément liés à des effets intrinsèques des nanotubes (le franchissement de la barrière intestinale n'a par exemple pas été mis en évidence). Ici encore, l'influence de la chimie de surface des NTC se fait sentir puisque comme dans le cas des cultures cellulaires, les NTC oxydés présentent généralement des seuils de toxicité plus faibles – probablement pour les mêmes raisons.

Ces résultats, bien que non-alarmistes, suggèrent des recommandations de précaution quant à la manipulation des NTC (milieu professionnel) et de réflexion avant leur incorporation dans des produits de grande consommation susceptibles de contaminer l'environnement, que ce soit en cours d'utilisation (pneumatiques par exemple) ou en fin de cycle de vie. Comme toute autre nanoparticule, les NTC ne devraient être mis en œuvre que lorsqu'aucun contact direct n'est possible avec l'utilisateur lors d'une utilisation normale du produit. Les NTC peuvent être incinérés, ce qui permet de les éliminer en fin de vie. Les résultats de cette étude soulignent aussi l'influence des modèles cellulaires utilisés et des tests de toxicités réalisés dans les laboratoires de recherche sur les résultats annoncés et incitent à une grande prudence pour l'interprétation des données expérimentales.
