

# **Effets des nanotubes de carbone sur l'appareil respiratoire. Rôle de leurs caractéristiques physico-chimiques**

Jorge Boczkowski - Directeur de Recherche Inserm, Institut Mondor de Recherche Biomédicale (UMR INSERM 955, Université Créteil Paris Est), 8 rue du général Sarrail, 94010 Créteil, jorge.boczkowski@inserm.fr

Sophie Lanone – Chargée de Recherche Inserm, Institut Mondor de Recherche Biomédicale (UMR INSERM 955, Université Créteil Paris Est), 8 rue du général Sarrail, 94010 Créteil, sophie.lanone@inserm.fr

Pascale Launois - Directeur de recherche au CNRS, Laboratoire de Physique des Solides (UMR CNRS 8502, université Paris Sud 11), 91405 Orsay CEDEX, launois@lps.u-psud.fr

Julien Cambedouzou – Maître de Conférence en Physique Université Paris Sud 11, Laboratoire de Physique des Solides (UMR CNRS 8502, université Paris Sud 11), 91405 Orsay CEDEX, cambedouzou@lps.u-psud.fr

Ghislaine Lacroix, (INERIS (Equipe Toxi, Verneuil-en-Halatte), ghislaine.LACROIX@ineris.fr  
Françoise Rogerieux, INERIS (Equipe Toxi, Verneuil-en-Halatte), francoise.rogerieux@ineris.fr

Dan Elgrabli, INERIS (Equipe Toxi, Verneuil-en-Halatte), dan.elgrabli@ineris.fr

Jean-Paul Morin, (INSERM U644 en partenariat avec le CERTAM, Centre d'Etudes et de Recherches Technologiques en Aérothermique et Moteurs, Rouen), jean-paul.morin@univ-rouen.fr

Frantz Gouriou, CERTAM, (Centre d'Etudes et de Recherches Technologiques en Aérothermique et Moteurs, Rouen), frantz.gouriou@certam-rouen.com

Yannick Crémillieux - Directeur de recherche au CNRS, Créatis-LRMN, Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire (UMR CNRS 5220, U630 INSERM), Lyon, yannick.cremillieux@u-bordeaux2.fr

Emmanuelle Canet-Soulas, Créatis-LRMN (Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire, UMR CNRS 5220, U630 INSERM), Lyon, emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr

## **Objectif principal**

Evaluation de la relation entre les effets toxicologiques respiratoires des nanotubes de carbone (NT) et leurs caractéristiques physico-chimiques (dimensions, présence de métaux, état d'agglomération, état de surface).

## **Objectifs secondaires**

Mise au point d'un système permettant de générer un aérosol de nanotubes de carbone et comparaison des effets des nanotubes lors de l'exposition en suspension ou en aérosol,  
Evaluation des modifications éventuelles des nanotubes de carbone dans les cellules, et

Examen de la distribution des nanotubes de carbone dans l'organisme, avec aussi une modélisation de cette distribution.

## **Matériels et méthodes**

### *1. Nanotubes utilisés.*

- Nanotubes monoparois (SWNT) bruts et purifiés des nanoparticules catalytiques, lots achetés auprès de Unidyne (Houston-TX, USA).
- Nanotubes multiparois (MWNT) coupés par bain ultrason pendant plusieurs semaines (réalisés dans l'équipe de M. Mayne-L'Hermite et M. Pinault (LFP, CNRS-CEA, Saclay), dont la distribution de longueurs est majoritairement comprise entre 3 et 8  $\mu\text{m}$ .
- MWNT obtenus par des croissances de courtes durées et dont la longueur est comprise entre 5 et 15  $\mu\text{m}$ .

### *2. Méthodes d'étude des NT (hors cellules et dans intra-cellulaire)*

Les méthodes suivantes ont été utilisées pour caractériser les NT :

- DRX (diffraction des rayons X),
- SEM (« Scanning Electron Microscopy »),
- MET (microscopie électronique de transmission) standard et haute résolution,
- HAADF-STEM (High Annular Angle Dark Field scanning electron microscopy) et EELS (« Electron Energy Loss Spectroscopy »),
- ATG (analyse thermogravimétrique, collaboration avec l'équipe de M. Mayne-L'Hermite au Laboratoire Francis Perrin, CEA Saclay),
- XPS ("X Photoelectron Spectroscopy", collaboration avec l'équipe de M. Mayne-L'Hermite au Laboratoire Francis Perrin, CEA Saclay)
- Analyses en micro-fluorescence X et micro-XANES (rayonnement synchrotron, ESRF, Grenoble)

### *3. Méthode de génération d'un aérosol de NT.*

Une méthode mécanique de remise en suspension a été utilisée (PALAS RBG1000). Dans cette méthode un générateur permet de disperser une quantité volumique prédéfinie de poudre (matière pulvérulente en vrac), de façon constante, continue et reproductible. Des SWNT bruts ont été utilisés.

Un système de filtration inertiel a permis de séparer la fraction non inhalable de la fraction inhalable en vue de la génération d'un aérosol stabilisé inhalable par les animaux. Afin d'enrichir la concentration massique de l'aérosol, il a été décidé de réaliser un seuil de coupure à un diamètre aérodynamique de 2,5  $\mu\text{m}$  (fraction PM2.5).

Un séparateur cyclonique PM 2.5 de microbalance TEOM fonctionnant à un débit de 1m<sup>3</sup>/h a été modifié afin de pouvoir récupérer la fraction non inhalable dans un réservoir prévu à cet effet. Le système d'exposition des animaux a été raccourci au maximum afin d'éviter les pertes par diffusion aux parois (les SWNT étant fortement électrostatiques, cette perte inévitable est assez élevée). Les effluents en aval ont été filtrés à l'aide d'un filtre à particules type SiC comportant une efficacité de 99,99% sur l'intégralité du spectre de taille (1nm-10 $\mu\text{m}$ ).

Des rats (mâles, Sprague-Dawley) ont été exposés pendant 4 jours consécutifs, 3 heures/jour, à un aérosol dont le diamètre aérodynamique moyen était de  $1\mu\text{m}$  et de concentration massique d'environ  $0,35\text{mg}/\text{m}^3$ . Le débit de chaque chambre d'exposition étant de  $0,72\text{m}^3/\text{h}$ , les animaux ont été exposés à une quantité de nanotubes équivalente à  $0,756\text{mg}$ . Des analyses des NT aérosolisés en microscopie électronique à transmission ont été effectués afin d'examiner si leur morphologie est altérée par le processus de mise en aérosol. Leur résultat est en cours d'analyse.

#### *4. Mise au point d'une technique de visualisation des NTC dans l'arbre respiratoire sans modifier leurs caractéristiques physico-chimiques par IRM avec de l'hélium 3 hyper polarisé*

Des suivis longitudinaux (2 semaines) ont été faits sur des rats exposés par instillation intratrachéale à des SWNT (bruts et super purifiés) pour évaluer la biodistribution par IRM. Le protocole d'imagerie comprend des acquisitions d'imagerie de ventilation pulmonaire utilisant l'hélium-3 hyper-polarisé comme agent de contraste qui diffuse dans le poumon et des acquisitions d'imagerie systémique standard (proton) pour évaluer un éventuel passage à travers les barrières pulmonaires. Le protocole d'imagerie a été complété par des études post-mortem (histologie, dosage chimique, études biochimiques et biomoléculaires) à l'INERIS.

### **Principaux résultats scientifiques**

#### *1. Caractérisation des NT.*

Un travail de caractérisation très détaillée des NT a été effectué tout au long du projet. Ce travail de caractérisation a permis de mettre au point l'utilisation « en routine » de méthodes de caractérisation physico-chimiques complémentaires : DRX, MEB, ATG et XPS. Nous avons aussi montré l'importance de caractériser systématiquement chaque lot d'échantillon (différences de diamètres et de contenu en fer (catalyseur) entre lots de SWNT d'un même fournisseur, contamination inattendue au titane sur une série de MWNT mise en évidence, à laquelle nous avons pu ensuite remédier).

#### *2. Mise en évidence du rôle de la taille et de la réactivité de surface de nanotubes de carbone dans leurs effets cytotoxiques et inflammatoires. Démonstration du rôle de l'augmentation du calcium endogène dans ces phénomènes à l'aide de la microscopie de fluorescence X par rayonnement synchrotron. Analyse de l'influence de l'état d'agrégation des nanotubes (Bussy et al, Nanoletters 2008 ; Tabet et al, J Toxicol Env Health A 2009 ; Bussy et al, manuscrit soumis pour publication).*

Nous avons analysé l'effet de la longueur des NT et de leur chimie de surface sur la viabilité et la réponse inflammatoire cellulaire en examinant la réponse de macrophages murins à des MWNT non coupés et coupés par exposition à des ultrasons pendant 7 semaines. Les NT ainsi obtenus sont plus courts que les non coupés. Les NT ainsi obtenus présentent une longueur moyenne de  $4,8\mu\text{m}$  (14% de NT avec une longueur de  $> 10\mu\text{m}$ ) contre  $9,5\mu\text{m}$  (47% de NT avec une longueur de  $> 10\mu\text{m}$ ), pour les non coupés. En ce qui concerne la réponse biologique, les NT coupés et non coupés diminuent la viabilité cellulaire de manière similaire. Cependant, dans le cas des NT coupés, on observe une réponse inflammatoire et oxydative qui est absente dans les cellules exposées aux NT non coupés. L'analyse des caractéristiques de surface des NT ainsi que de l'état des nanoparticules catalytiques présentes dans l'échantillon montre une augmentation des groupements COOH, du fer oxydé et des défauts de structure dans les NT coupés par rapport aux non coupés. Ces différences, qui apparaissent après le long traitement aux ultrasons, expliquent probablement la réponse inflammatoire et oxydative aux NT coupés. Ces résultats montrent l'interaction entre différentes propriétés physico-chimiques des NT dans leurs effets biologiques. Ils soulignent aussi la difficulté à modifier un paramètre physique (la longueur dans le cas présent), sans en modifier d'autres (la réactivité de surface par exemple).

Afin de localiser les NT à l'intérieur des cellules et de détecter d'éventuelles modifications chimiques des cellules après leur internalisation, nous avons effectué des expériences de

microfluorescence X à l'ESRF de Grenoble (collaboration avec l'équipe de J. Doucet au LPS-Orsay) sur des macrophages exposés aux nanotubes. Ces expériences ont été associées à une caractérisation de la morphologie cellulaire en microscopie optique et électronique. Les principaux résultats de ces expériences montrent que la microfluorescence X permet de détecter des NT dans les cellules dans des conditions où les techniques de microscopie électronique standard ne le permettent pas. Cette détection est basée sur la mise en évidence du signal du fer des particules catalytiques des NT. Par ailleurs, cette technique nous a permis de constater une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire dans les cellules exposées à certains nanotubes. Des analyses de la viabilité et la réponse inflammatoire cellulaire en présence d'un chélateur du calcium intracellulaire et d'un inhibiteur de la calmoduline nous ont permis de montrer le rôle du calcium dans la réponse cytotoxique et inflammatoire déclenchée par les NT. Ces résultats constituent la première démonstration du rôle du calcium dans la réponse cellulaire aux NT.

Afin d'examiner l'effet de la formation d'agrégats des NT sur leurs effets cellulaires, nous avons regardé l'effet de la dispersion des NT dans différents milieux sur des cellules épithéliales et mésothéliales humaines (A549 et MET5A) et comparé ces effets aux fibres d'amiante. Les principaux résultats de cette étude montrent que les MWNT et les fibres d'amiante induisent une diminution similaire de l'activité métabolique des cellules A549 et Met5A. Les mécanismes moléculaires sous-jacents semblent cependant différents, que ce soit en termes d'induction d'un phénomène d'apoptose, ou d'internalisation des nanomatériaux. L'ensemble de ces résultats suggère que, malgré une similarité de forme (tubulaire/fibreuse), les effets biologiques induits par ces deux types de nanomatériaux sont différents. D'autre part, aucun effet de modifications du degré de dispersion des NTC n'a pu être observé.

### *3. Analyse des modifications du fer contenu dans des nanotubes de carbone à l'intérieur de cellules inflammatoires (Bussy et al, manuscrit soumis pour publication).*

Nous avons analysé les modifications du fer attaché aux SWNT bruts à l'intérieur des macrophages. Les principaux résultats de cette étude montrent que certaines nanoparticules de fer initialement attachées aux SWNT apparaissent libres dans le cytoplasme et le noyau des macrophages. De plus la signature chimique de ces nanoparticules est différente de celle des nanoparticules présentes dans les SWNT avant exposition des cellules et de celles présentes dans les cellules mais encore attachées aux SWNT. Ces résultats montrent la bioaccessibilité du fer contenu dans les SWNT dans nos conditions expérimentales. Ces résultats ont des implications potentiellement importantes compte tenu du rôle du fer dans la physiopathologie du stress oxydant, un des mécanismes postulés comme étant à l'origine des effets toxicologiques des SWNT.

### *4. Comparaison des effets pulmonaires des SWNT bruts et super purifiés chez le rat.*

La réponse biologique est similaire suite à l'exposition par instillation intratrachéale à des SWNT bruts contenant une forte quantité de fer (20%) ou à des SWNT super purifiés contenant une faible quantité de fer (2%). Dans les deux cas, la formation de granulomes, la présence de biomarqueurs de l'inflammation, du stress oxydant, de l'apoptose et de la phagocytose ont été notées, ces effets se manifestant plus précocement pour les SWNT bruts. Par ailleurs, il semblerait que les SWNT bruts, contenant une plus forte quantité de fer, soient pris en charge et éliminés plus rapidement que les SWNT super purifiés.

### *5. Génération d'un aérosol de nanotubes de carbone et analyse des effets pulmonaires chez le rat.*

Comme signalé plus haut, des rats ont été exposés pendant 4 jours consécutifs, 3 heures/jour, à un aérosol des NT dont le diamètre aérodynamique moyen était de  $1\mu\text{m}$  et de concentration massique d'environ  $0,35\text{mg}/\text{m}^3$ . Le débit de chaque chambre d'exposition étant de  $0,72\text{m}^3/\text{h}$ , les animaux ont été exposés à une quantité totale de NT équivalente à  $0,756\text{ mg}$ . Un groupe contrôle d'animaux exposés à l'air et un autre constitué des animaux

exposés à la même quantité de SWNT mais administrés par instillation intratrachéale ont été examinés. Les animaux ont été autopsiés le lendemain du dernier jour d'exposition.

Les premiers résultats portant sur la cellularité du lavage broncholavéolaire ne montrent pas de différences significatives entre les animaux exposés et contrôles quel que soit le mode d'exposition. Il n'y a pas non plus de différences significatives dans la sécrétion de marqueurs de l'inflammation dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (protéines totales, IL-1b, IL-6, GRO-KC). En revanche, une induction de l'expression d'HO-1, un marqueur de stress oxydant, a été notée chez les animaux instillés, surtout à 1 jour et dans une moindre mesure à 4 jours post-instillation et chez les animaux exposés par inhalation. Des analyses sont en cours pour caractériser d'autres paramètres inflammatoires et pour examiner l'histologie pulmonaire.

*6. Mise au point d'une technique de visualisation des NTC dans l'arbre respiratoire sans modifier leurs caractéristiques physico-chimiques par IRM avec de l'hélium 3 hyper polarisé (Al Faraj et al, Nanoletters 2009 ; Al Faraj et al, Nanotechnology 2010).*

L'IRM pulmonaire utilisant l'hélium-3 hyper-polarisé, permet de détecter les SWNT bruts (contenant 0.05 mg d'impuretés de fer) dans le poumon des animaux après instillation intratrachéale. Une diminution du signal IRM est observée avec la présence des SWNT jusqu'à 2 jours après instillation. Cet effet diminue avec le temps. Ceci est dû à une distribution plus homogène des nanotubes dans le poumon ou bien à leur encapsulation dans des granulomes autour des agrégats de nanotubes présents dans les poumons (phénomène observable à long terme).

Les analyses d'histopathologie montrent la présence de granulomes multifocaux encapsulant les agrégats de nanotubes à partir du 7<sup>ème</sup> jour près instillation intratrachéale. Les images en microscopie électronique confirment l'accentuation de l'inflammation avec le temps et la dose de nanotubes instillés, observée en IRM pulmonaire proton, et se manifeste par une forte déposition de fibres de collagène (CF) et montrent que les pneumocytes type II (ATII) et les macrophages alvéolaires (AM) forment le mécanisme de défense principal contre la nanotoxicité aiguë des nanotubes.

L'IRM proton ne permet pas de détecter la présence de SWNT dans les organes systémiques après instillation intratrachéale. Par contre après injection intraveineuse, une accumulation transitoire de SWNT est détectée dans la rate et les reins et confirmée par analyse histologique.

## **Conclusion**

Les expériences effectuées pendant ce projet nous ont permis d'avancer dans la connaissance des effets biologiques des NT et de leur relation avec les propriétés physico-chimiques. Des techniques nouvelles ont été utilisées pour caractériser les NT dans les cellules et dans l'organisme entier. Des données très originales sur la transformation des NT dans les cellules ont été également obtenues.

## **Publications**

Carbon nanotubes in macrophages: imaging and chemical analysis by synchrotron X-ray fluorescence microscopy

Cyrill Bussy, Julien Cambedouzou, Sophie Lanone, Emilie Leccia, Vasile Heresanu, Mathieu Pinault, Martine Mayne-l'Hermite, Marine Cotte, Jean Doucet, Jorge Boczkowski, Pascale Launois.

*Nano Letters*, 8: 2659-2663, 2008

In Vivo Imaging of Carbon Nanotubes Biodistribution Using MRI

Achraf Al Faraj, Katarzyna Cieslar, Ghislaine Lacroix, Sophie Gaillard, Emmanuelle Canet-Soulas, and Yannick Crémillieux.

*Nano Letters*, 9: 1023-1027, 2008

Adverse effects of industrial multi-walled carbon nanotubes on human pulmonary cells.

Lyes Tabet, Cyrill Bussy, Nadia Amara, Ari Setyan, Alain Grodet, Michel J. Rossi, Jean-Claude Pairon, Jorge Boczkowski, Sophie Lanone.  
*J Toxicol Env Heath A. 72:60-73, 2009*

Long-term follow-up of lung biodistribution and effect of instilled SWCNTs using multiscale imaging techniques. Achraf Al Faraj, Amine Bessaad, Katarzyna Cieslar, Ghislaine Lacroix, Emmanuelle Canet-Soulas, and Yannick Crémillieux  
*Nanotechnology, 21:175103, 2010*

Embedding Carbon Nanotubes With a Polystyrene-based Polymer Protects Against Pulmonary Toxicity.  
Lyes Tabet, Cyrill Bussy, Ari Setyan, Michel J. Rossi, Jorge Boczkowski, Sophie Lanone  
*Part Fiber Toxicol (en révision)*

Effect of length and surface chemistry of carbon nanotubes on cell viability, oxidative stress and inflammation  
Cyrill Bussy, Julien Cambedouzou, Mathieu Pinault, Martine Mayne-l'Hermite, Jorge Boczkowski, Pascale Launois, Sophie Lanone  
*Soumis pour publication*

Iron catalyst nanoparticles from carbon nanotubes are detached and chemically modified inside macrophages.  
Cyrill Bussy, Julien Cambedouzou, Barbara Fayard, Mathieu Pinault, Esther Belade, Nathalie Brun, Claudie Mory, Vincent De Andréade, Jorge Boczkowski, Pascale Launois, Sophie Lanone  
*Soumis pour publication*

### **Communications scientifiques**

17 communications affichées

14 communications orales