



NTT : 2012 EMSE 0646

## THÈSE

Présentée par

*Mélanie PAILLEUX*

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

Spécialité : Génie des procédés

# *Etude in vitro de la toxicité de nanoparticules de boehmite*

Soutenue à Saint Etienne, le 2 mars 2012

### Membres du jury

Rapporteurs :	Jean-François HOICHEPIED	Chargé de recherche, Ecole des Mines de Paris
	Armelle BAEZA-SQUIBAN	Maître de conférences, Université Paris Diderot 7
	Philippe GROSSEAU	Directeur de recherche, Ecole des Mines de Saint Etienne
	Michèle COTTIER	Professeur des Universités, CHU de Saint Etienne
	Didier BERNACHE-ASSOLLANT	Professeur, Ecole des Mines de Saint Etienne
	Christian VILLIERS	Chargé de recherche, institut Albert Bonniot de La Tronche
	Delphine BOUDARD	Maître de conférences des Universités, CHU de Saint Etienne
	Jérémie POURCHEZ	Chargé de recherche, Ecole des Mines de Saint Etienne
	Patrick SEBASTIEN	Directeur Hygiène Industrielle, Saint Gobain HPM, Cavailon

## ■ Spécialités doctorales :

SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX  
MECANIQUE ET INGENIERIE  
GENIE DES PROCEDES  
SCIENCES DE LA TERRE  
SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT  
MATHEMATIQUES APPLIQUEES  
INFORMATIQUE  
IMAGE, VISION, SIGNAL  
GENIE INDUSTRIEL  
MICROELECTRONIQUE

## Responsables :

J. DRIVER Directeur de recherche – Centre SMS  
F. GRUY Professeur – Centre SPIN  
B. GUY Maître de recherche – Centre SPIN  
J. BOURGOIS Professeur – Fayol  
E. TOUBOUL Ingénieur – Fayol  
O. BOISSIER Professeur – Fayol  
J.C. PINOLI Professeur – Centre CIS  
P. BURLAT Professeur – Fayol  
Ph. COLLOT Professeur – Centre CMP

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

AVRIL	Stéphane	MA	Mécanique & Ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	MA	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
BENABEN	Patrick	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
BERNACHE-ASSOLANT	Didier	PR 0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean-Pierre	MR	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaïd	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR 1	Informatique	Fayol
BORBELY	Andras	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	MA	Génie Industriel	Fayol
BOUDAREL	Marie-Reine	PR 2	Génie Industriel	DF
BOURGOIS	Jacques	PR 0	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
BRODHAG	Christian	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
BURLAT	Patrick	PR 2	Génie industriel	Fayol
COLLOT	Philippe	PR 1	Microélectronique	CMP
COURNIL	Michel	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR 1	Génie industriel	CMP
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DECHOMETS	Roland	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
DESRAYAUD	Christophe	MA	Mécanique & Ingénierie	SMS
DELAFOSSÉ	David	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR 1	Génie Industriel	Fayol
DRAPIER	Sylvain	PR 2	Mécanique & Ingénierie	SMS
DRIVER	Julian	DR 0	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FEILLET	Dominique	PR 2	Génie Industriel	CMP
FOREST	Bernard	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CIS
FORMISYN	Pascal	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GIRARDOT	Jean-Jacques	MR	Informatique	Fayol
GOEURIOT	Dominique	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
GROSSEAU	Philippe	MR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	MR	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GUYONNET	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
HERRI	Jean-Michel	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
INAL	Karim	PR 2	Microélectronique	CMP
KLÖCKER	Helmut	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
LERICHE	Rodolphe	CR CNRS	Mécanique et Ingénierie	SMS
LI	Jean-Michel	EC (CCI MP)	Microélectronique	CMP
MALLIARAS	George Grégory	PR 1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	MA	Mécanique et Ingénierie	SMS
MONTHILLET	Frank	DR 1 CNRS	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
PERIER-CAMBY	Laurent	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean-Charles	PR 0	Image, Vision, Signal	CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
SZAFNICKI	Konrad	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	Fayol
THOMAS	Gérard	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
TRIA	Assia		Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean-Paul	MR	Génie des procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR 1	Génie industriel	CIS

### Glossaire :

PR 0	Professeur classe exceptionnelle
PR 1	Professeur 1 <sup>ère</sup> catégorie
PR 2	Professeur 2 <sup>ème</sup> catégorie
MA(MDC)	Maître assistant
DR	Directeur de recherche
Ing.	Ingénieur
MR(DR2)	Maître de recherche
CR	Chargé de recherche
EC	Enseignant-chercheur
IGM	Ingénieur général des mines

### Centres :

SMS	Sciences des Matériaux et des Structures
SPIN	Sciences des Processus Industriels et Naturels
Fayol	Institut Henri Fayol
CMP	Centre de Microélectronique de Provence
CIS	Centre Ingénierie et Santé



NTT : 2012 EMSE 0646

## THÈSE

Présentée par

*Mélanie PAILLEUX*

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

Spécialité : Génie des procédés

# *Etude in vitro de la toxicité de nanoparticules de boehmite*

Soutenue à Saint Etienne, le 2 mars 2012

### Membres du jury

Rapporteurs :	Jean-François HOCHÉPIED	Chargé de recherche, Ecole des Mines de Paris
	Armelle BAEZA-SQUIBAN	Maître de conférences, Université Paris Diderot 7
	Philippe GROSSEAU	Directeur de recherche, Ecole des Mines de Saint Etienne
	Michèle COTTIER	Professeur des Universités, CHU de Saint Etienne
	Didier BERNACHE-ASSOLLANT	Professeur, Ecole des Mines de Saint Etienne
	Christian VILLIERS	Chargé de recherche, institut Albert Bonniot de La Tronche
	Delphine BOUDARD	Maître de conférences des Universités, CHU de Saint Etienne
	Jérémie POURCHEZ	Chargé de recherche, Ecole des Mines de Saint Etienne
	Patrick SEBASTIEN	Directeur Hygiène Industrielle, Saint Gobain HPM, Cavailon



*A ma famille*



*Le point d'honneur n'est pas toujours d'être dans le vrai.  
Il est d'oser, de proposer des idées neuves et ensuite de les vérifier.*

*Pierre-Gilles de Gennes*





# REMERCIEMENTS

Ce manuscrit marque l'aboutissement de trois années de travail intense, enrichissant, passionnant et de belles rencontres. Ceci est donc l'occasion de remercier tous ceux qui m'ont suivi, de près ou de loin, pour leur soutien moral ou technique, leurs encouragements et leurs conseils.

Tout d'abord je souhaite remercier tous les membres de mon jury Armelle Baeza-Squiban et Jean-François Hoche pied de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse, mais aussi pour l'attention et les remarques constructives portées à ce travail. Merci au Professeur Didier Bernache pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse ainsi qu'à Christian Villiers d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail et Patrick Sébastien pour son enthousiasme et son implication dans ce projet pluridisciplinaire.

Je souhaite remercier ensuite Michèle Cottier et Philippe Grosseau mes deux directeurs de thèse de m'avoir donné la possibilité de réaliser cette thèse et de m'avoir fait confiance durant ces trois années. Merci aussi pour votre disponibilité et vos conseils avisés.

Merci aussi à mes deux co-encadrants qui m'ont été d'une aide précieuse.

Merci à Delphine Boudard, pour tout le temps que tu m'as consacré, merci aussi pour tout ce que tu m'as appris, tes compétences en biologie, tous tes conseils, ta rigueur. Tu as vraiment été d'une aide précieuse et indispensable. Merci aussi pour tous les bons moments qu'on a passé la découverte du Sh'Bam, Edimbourg et le haggis que tu aimes tant, notre déplacement à Aix en Provenance et Marseille où l'on a rencontré différentes stars (celle du rond point, la star de l'essais comète (Mimi) mais surtout Jean Paul Bauer de plus belle la vie) sans oublier le coffre ouvert et l'incident sur le parking du mc Do. Tous ces nombreux fous rires me permettront d'effacer les coups de cahier que tu m'as infligé !!! Je te souhaite vraiment tout le bonheur que tu mérites que se soit dans un cadre professionnel ou personnel. Ah j'allais oublié : Pâques approche...

Merci à Jérémie Pourchez pour son immense disponibilité et ses idées qui fusent plus vite que la lumière. Merci pour ta motivation débordante qui m'a permis de toujours être à 100%. Merci pour tous tes conseils et tout le temps que tu m'as consacré.

Je n'oublierai jamais ton freinage de dernière minute à Turin ou Cavaillon par exemple ce qui a failli me guillotiner ! Ainsi que le whisky smocky d'Edimbourg, tellement smocky qu'on aurait dit de la cendre de cheminée mais comment peut on avaler ça, je préfère vraiment de loin le coca light d'ailleurs j'attend toujours mon jerrican !!

Merci aussi à Valérie Forest, la femme de l'ombre, qui nous a rejoint durant ma thèse ! Merci pour ton œil nouveau sur ces travaux et tous tes précieux conseils ! Merci pour le temps que tu as consacré à mes articles, à mon manuscrit. Merci de m'avoir fait découvrir Suza car grâce à toi je sais maintenant que Chez Z..i c'est ENOOOORME !! Merci aussi pour la découverte du tango à Marseille et j'espère que tu trouveras bientôt ce bel argentin!!!

Je tiens ensuite à remercier Valérie Bin, la super technicienne du LINA !! Merci de t'être occupée de toute la culture cellulaire, merci aussi pour tous tes conseils et le temps que tu m'as consacré. J'ai vraiment adoré réalisé les tests en binôme avec toi je pense particulièrement au concours de remplissage de plaque !! Mais j'ai aussi adoré papoter avec toi autour d'une tasse de thé ou une coupe de champagne pour les grandes occasions ainsi qu'échanger des astuces pour les énigmes du professeur Layton. Je vous souhaite à Clément et toi beaucoup de bonheur et de réussite.

Une grande pensée pour les autres doctorants du LINA.

Pour commencer Lara, je pense que nous avons eu beaucoup de chance d'avoir des sujets assez proches et que nous avons ainsi pu avancer plus rapidement ensemble en profitant des savoirs et des conseils de chacune. Merci de m'avoir aidé à me faire une petite place au niveau de la fac. Les manip en chanson c'étaient extra (♪ Help, I need somebody Help,... ♪). J'ai adoré aussi nos déplacements professionnels à Edimbourg et à Nantes (même si on s'est fait insulté, craché dessus et qu'un vieux bourré plein de sang aurait pu nous tuer !!!). J'ai encore plus adoré te faire découvrir la Tunisie, on repars quand tu veux...

Je pense aussi à Iolanda notre rayon de soleil, Jean-Philippe et sa bonne humeur permanente, Gabriele l'overbooké et Andréa et Agathe les petites nouvelles.

Je vous souhaite à tous bon courage, même si je suis sûre que tout se passera bien pour vous je vous souhaite de vous épanouir dans votre activité professionnelle et dans votre vie personnelle.

Je tiens maintenant à remercier l'ensemble du laboratoire BiiGC dirigé par le Professeur Gain et le Professeur Thuret, avec qui nous avons partagés nos locaux durant ma thèse. Merci à Simone Piselli pour ses conseils et son aide précieuse mais aussi pour ses discussions passionnantes sur ses différents voyages (ça fait rêver !!!). Je pense aussi à toutes les autres personnes constituant ce labo qui m'ont très bien accueilli, Nelly, Aurélien P, Zigho, Aurélien B, Binh Minh, Chaker, Olivier, vous formez une bien belle équipe !!!! Je vous souhaite à tous un très bel avenir, et que tous vos projets se réalisent autant sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie chaleureusement Bice Fubini – Directrice de Recherche au centre interdépartemental « G. Scansetti » sur l'étude des amiantes et de la toxicité particulière de la faculté de pharmacie de l'Université de Turin – de m'avoir accueillie dans son département lors de mon séjour à Turin. Merci à Bice Fubini et Maura Tomatis de m'avoir donné l'opportunité de travailler à leur côté, pour le temps qu'elles m'ont accordé, leur aide précieuse dans les manip, leur rigueur scientifique et leurs qualités humaines. Je garderai d'excellents souvenirs de mon passage à Turin, tant sur le plan humain que professionnel.

Je vais maintenant remercier les personnes de l'école des Mines avec qui j'ai passé le plus clair de mon temps.

Comment ne pas commencer par Timothée !!! Je pense que je n'aurai pas pu rêver mieux comme co-bureau. Merci pour ton aide et tes différents conseils, merci pour ton calme et ta bonne humeur et pour tous les fous rires partagés. Outre être un super sportif (aller faire 100km de courses à pied dans la montagne faut vraiment être taré !!), tu es aussi un excellent jardinier (les bambous ont été si affecté par ton départ qu'ils en sont morts), cuisinier (merci aussi de m'avoir fait découvrir ta spécialité : la pizza micro ondes !!), conseiller en mode... Je te souhaite de réussir comme tu le souhaites dans ta vie professionnelle et personnelle mais je

n'en ai aucun doute car Timothée t'es trop fort !!!

Je souhaite remercier toutes les personnes des centre SPIN et CIS que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant ces 3 années. Merci à tous les permanents, aux techniciens qui m'ont beaucoup aidé et à tous les doctorants.

Je souhaite remercier plus particulièrement tout le laboratoire PMMC. Merci à Carole de t'être aussi bien occupé de moi : commandes, réservations, déplacements... merci aussi pour ta bonne humeur et ton rire communicatif, j'en profite aussi pour remercier Françoise ! Vous formez un beau duo toutes les deux !

Merci à Marie Claude plus connu sous le nom de MCB ! Merci pour ce que tu as fait pour moi et les autres, tout le temps que tu nous consacres. Merci pour tous les bons moments qu'on a passé que ce soit à l'école ou ailleurs. Je n'oublierai jamais l'épisode de la tarte aux poires sauce chocolat !

Merci à Laetitia P pour les nombreux échanges et fous rires, les excursions à Promod, je suis très heureuse de t'avoir initié au foot !

Merci à Laetitia V la jeune maman, merci pour tous tes conseils et ton rire inoubliable, merci de m'avoir fait découvrir les leggings léopard ;-).

Merci aussi à tous les autres, Henri, Alex, Jérôme, Coralie, Thomas, Lydie, Akira, Antoine, Sebastien, Estelle, Agathe, Mounir, Omar, Pauline, Franck, Maxime, Nathalie, Emmanuelle, Fred, Fatima et à ceux qui sont déjà partis JC, Marthe, Mélanie A, Najih... Désolée pour ceux que j'ai probablement oublié.

Merci aussi à toute l'équipe soccer 5, ils se reconnaîtront.

Je souhaite finir, mais peut-être aurais-je dû commencer par elles, par toutes les personnes qui comptent le plus pour moi et à qui je dédie ce manuscrit. Tout d'abord à ma famille et plus particulièrement à mes parents qui sont à l'origine de tout et qui m'ont toujours supportée (dans tous les sens du terme !!!) au cours de mes longues études, à mon frère. Une grande pensée à Jawher qui m'a énormément soutenue. Mais aussi à mes amis qui m'ont toujours bien entourés, je pense plus particulièrement à Astrid, Bécasse, Christophe X2, Claire, Emilie, Jean, Jérémy, Julie, Laura, Mémé, Pauline, Romain, Sonia, Sylvain, Véro, Vincent, Zouz. Je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur et de réussite aussi bien au niveau professionnel que personnel.





# TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	1
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	17
Introduction	21
Chapitre I. Etude bibliographique	27
<b>I.1. Contexte de l'étude</b>	<b>31</b>
I.1.1. Le monde des nanotechnologies	31
I.1.2. Devenir des nanoparticules dans l'organisme	41
I.1.3. Nanotoxicologie	60
I.1.4. Etat de l'art sur la biotoxicité de la boehmite	73
I.1.5. Activité biologique	76
<b>I.2. Nanoparticules étudiées : la boehmite</b>	<b>83</b>
I.2.1. Boehmite	83
I.2.2. Procédés de synthèse	85
I.2.3. Solubilité de la boehmite	91
<b>I.3. Objectif de l'étude</b>	<b>96</b>
Chapitre II. Matériels et méthodes	99
<b>II.1. Caractérisation physico chimique des nanoparticules</b>	<b>103</b>
II.1.1. Présentation des poudres étudiées	103
II.1.2. Techniques analytiques	103
<b>II.2. Modèle biologique et tests de cyto-génotoxicité</b>	<b>121</b>
II.2.1. Culture <i>in vitro</i> de macrophages de souris	121

II.2.2.	Techniques d'évaluation de l'activité biologique	125
II.2.3.	Toxicologie génétique	132

## Chapitre III. Données Physicochimiques des particules de boehmite 139

---

### **III.1. Les poudres industrielles 143**

III.1.1.	Forme et granulométrie	143
III.1.2.	Potentiel zêta et point isoélectrique	154
III.1.3.	Evaluation de l'agrégation	157
III.1.4.	Fraction aérosolisée	159
III.1.5.	Surface spécifique	162
III.1.6.	Structure cristalline	164
III.1.7.	Analyse chimique et de surface des nanopoudres de boehmite	165
III.1.8.	Solubilité	167
III.1.9.	Résonance Paramagnétique Electronique	168
III.1.10.	Conclusion intermédiaire	170

### **III.2. Posts-Traitements appliqués aux particules industrielles 174**

III.2.1.	Récupération de la fraction fine	174
III.2.2.	Broyage	175
III.2.3.	Données physico-chimiques des particules après traitements	177
III.2.4.	Conclusion intermédiaire	179

### **III.3. Nanoparticules réalisées par synthèse hydrothermale à l'échelle du laboratoire 180**

III.3.1.	Forme et granulométrie	180
III.3.2.	Potentiel zêta et point isoélectrique	191
III.3.3.	Surface spécifique	192
III.3.4.	Structure cristalline	193
III.3.5.	Analyse chimique des poudres de boehmite	194



III.3.6. Conclusion intermédiaire	195
<b>III.4. Conclusion</b>	<b>197</b>
 Chapitre IV. Evaluation de la toxicité biologique des poudres de boehmite	 199
<b>IV.1. Poudres industrielles</b>	<b>203</b>
IV.1.1. Poudres industrielles brutes et traitées	203
IV.1.2. Evolution globale de l'activité biologique	218
IV.1.3. Génotoxicité	223
IV.1.4. Conclusion intermédiaire	225
<b>IV.2. Activité biologique des particules élaborées par synthèse hydrothermale</b>	<b>227</b>
IV.2.1. Activité biologique des particules avant dispersion	227
IV.2.2. Activité biologique des particules après dispersion	231
IV.2.3. Evolution globale de l'activité biologique	235
IV.2.4. Conclusion	239
<b>IV.3. Conclusion générale</b>	<b>241</b>
 Chapitre V. Interactions protéines - nanoparticules	 245
<b>V.1. Introduction</b>	<b>249</b>
<b>V.2. Etude du phénomène artéfactuel</b>	<b>249</b>
V.2.1. Dégradation du TNF- $\alpha$	250
V.2.2. Adsorption sur la paroi des puits	251
V.2.3. Adsorption sur les nanoparticules	252
<b>V.3. Cinétique d'adsorption</b>	<b>254</b>
<b>V.4. Loi de correction</b>	<b>255</b>
<b>V.5. Conclusion</b>	<b>257</b>

Conclusion-Perspectives \_\_\_\_\_ 261

Annexes \_\_\_\_\_ 291

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de vie et risque d'exposition (Extrait de <a href="http://www.nanosmile.org">www.nanosmile.org</a> ).....	22
Figure 2 : Approche classique à l'évaluation du risque (Ostiguy 2010).....	23
Figure 3 : Principales sources de nanoparticules (G. Oberdorster et al. 2005).....	31
Figure 4 : Exemples d'objets présents dans la nature dans une échelle de taille en nanomètres (Ibaseta 2007).....	32
Figure 5 : Schéma représentant les différents types de nanoparticules (Ibaseta 2007).....	33
Figure 6 : Schéma représentant la relation entre taille et surface spécifique (Zeyons 2008)...	34
Figure 7 : Evolution du rapport surface/volume (en bleu) et de la fraction d'atomes présents à la surface de la particule (en rouge) en fonction du diamètre de la particule (Witschger O., Fabries J-F. 2005; Simon-deckers 2008).....	35
Figure 8 : Récapitulatif des changements de propriétés des particules à l'échelle nanométrique (Luther, 2004).....	37
Figure 9 : Répartition en pourcent de l'impact économique global des nanotechnologies en 2010 (INERIS 2007) .....	38
Figure 10 : Evolution du nombre de publications annuelles contenant le groupe de mots «toxicité des nanoparticules » (Science Direct) .....	41
Figure 11 : Schéma de l'appareil respiratoire ( <a href="http://www.infovisual.info">www.infovisual.info</a> ).....	42
Figure 12 : Schéma et coupe transversale d'une terminaison bronchiale et d'un alvéole ( <a href="http://fr.wikipedia.org">http://fr.wikipedia.org</a> ).....	43
Figure 13 : Coupe du parenchyme pulmonaire (Welsch 2004) .....	44
Figure 14 : Schéma de la barrière alvéolo-capillaire (Nguyen 2009) .....	45
Figure 15 : Illustration des différents mécanismes de dépôts des particules inhalées dans les voies respiratoires (Hervé-Bazin & Collectif 2007) .....	47
Figure 16 : Pourcentage des particules déposées dans l'ensemble de l'appareil respiratoire et dans les différentes régions en fonction de la taille (Witschger O., Fabries J-F. 2005).....	48
Figure 17 : Système digestif de l'homme ( <a href="http://fr.wikipedia.org">http://fr.wikipedia.org</a> ).....	49
Figure 18 : Coupe schématique de la peau (Corre 2005).....	50
Figure 19 : Effets potentiels des particules ultrafines inhalées (G. Oberdorster et al. 2007)...	53
Figure 20 : Schéma du corps humain avec les voies d'exposition aux nanoparticules et les organes touchés (Buzea et al. 2007).....	54
Figure 21 : Différents mécanismes d'internalisation (Conner & S. Schmid 2003a).....	56

Figure 22 : Mécanisme de phagocytose avec les principales étapes (Extrait de Pearson Education, mad-physio.blogspot.com).....	58
Figure 23 : Cliché MEB d'un macrophage au contact d'une fibre d'amiante .....	59
Figure 24 : Principaux paramètres physico chimiques (Gaffet 2011).....	60
Figure 25 : Structure cristallographique du rutile et de l'anatase (Buzea et al. 2007).....	63
Figure 26 : Pourcentage de PMN recrutés dans les alvéoles pulmonaires après 24h d'inflammation déclenchée par instillation intratrachéale de particules de TiO <sub>2</sub> . (Oberdorster et al. 2000).....	64
Figure 27 : Les cinq principes de l'éco-conception des nanomatériaux (Morose 2010) .....	68
Figure 28 : De l'ADN au chromosome ( <a href="http://membres.lycos.fr/coursgenetique">http://membres.lycos.fr/coursgenetique</a> ).....	68
Figure 29 : Tests de génotoxicité effectués en fonction des altérations possibles de l'ADN en termes de lésions primaires, de mutations géniques, chromosomiques et génomiques (Auffan 2007).....	70
Figure 30 : Illustration de la couche corona et des compétitions d'adsorption des petites molécules et protéines à la surface des nanoparticules (X.-R. Xia et al. 2010). .....	71
Figure 31 : Estimation de la fraction alvéolaire déposée et de la dose des aérosols inhalés d'AlOOH-40 nm/MMAD-0.6 µm et d'AlOOH-10 nm/MMAD-1,7 µm.....	74
Figure 32 : Comparaison de l'inflammation dans des lavages broncho-alvéolaires Les rats ont été exposés pendant 4 semaines (6 h / jour, 5 jours / semaine) à AlOOH-40 nm /MMAD-0.6 µm et à AlOOH-10 nm/MMAD-1.7 µm. Les points de données représentent la moyenne ± écart type de six rats mâles examinés à mi-parcours de la période d'étude (jour 10). .....	75
Figure 33 : Les modifications morphologiques de la nécrose (Roche Diagnostics).....	77
Figure 34 : Les modifications morphologiques de l'apoptose (Roche Diagnostics).....	78
Figure 35: Mécanisme de production des ROS et des RNS (Barus 2008).....	79
Figure 36 : Structure cristallographique de la boehmite (Raybaud et al. 2001).....	84
Figure 37 : Conditions optimales pour la précipitation de boehmite suivant le procédé sol-gel de B.E. Yoldas (Pernot-Gehin 2007) .....	86
Figure 38 : Diagramme de la formation de nanoparticules de boehmite (Naskar & Chatterjee 2005).....	87
Figure 39 : Schéma du dispositif de Spray Pyrolyse (Caiut et al. 2009).....	89
Figure 40 : Synthèse hydrothermales des particules de boehmite .....	90
Figure 41 : Diagramme de dissolution de l'aluminium (mole/kg d'H <sub>2</sub> O) en équilibre avec boehmite à 25°C (calcul ARXIM ; base de données SUPCRT).....	91
Figure 42 : Principe de la granulométrie laser (reproduction technique de l'ingénieur) .....	104
Figure 43 : Principe de mesure d'un granulomètre laser (reproduction technique de l'ingénieur).....	105

Figure 44 : Schéma de la double couche électrique d'une particule, et variation du potentiel électrostatique autour d'une sphère (Simon-deckers 2008) .....	107
Figure 45: Principe des différentes étapes d'adsorption d'un gaz à la surface d'un solide (Bouhmadi 2009).....	110
Figure 46 : Schéma de diffraction de rayons X par une famille de plan (hkl), $\theta$ angle de Bragg (Helfen 2004) .....	111
Figure 47 : Différentes zones dans la torche à Plasma (Extrait de <a href="https://moodle.insa-rouen.fr/">https://moodle.insa-rouen.fr/</a> ).....	112
Figure 48 : Schéma d'un appareillage d'analyse par émission (Extrait de <a href="http://www.emse.fr">www.emse.fr</a> ) ...	112
Figure 49 : Principe de la photoémission (Ekoue 2002) .....	114
Figure 50 : Schéma d'un chargeur corona (Dekati 2003) .....	116
Figure 51 : Principe de fonctionnement de la séparation des particules (Dekati 2003).....	117
Figure 52 : Principe de la mesure en RPE (Réglier s. d.).....	118
Figure 53 : Principe de génération de radicaux HO <sup>•</sup> via des réactions impliquant des espèces métalliques (activité de Fenton) avec piégeage dans du DMPO. Observation du signal correspondant à l'adduit [DMPO-OH] <sup>•</sup> (Boumahdi) .....	120
Figure 54 : Principe de génération de radicaux COO <sup>•</sup> avec piégeage dans du DMPO. Observation du signal correspondant à l'adduit [DMPO-COO] <sup>•</sup> (Boumahdi).....	120
Figure 55 : Macrophages (RAW 264.7) observés au microscope électronique à balayage (A) et au microscope optique après coloration MGG (B) .....	122
Figure 56 : Schéma d'une cellule de Thoma.....	123
Figure 57 : Principe du dosage de la LDH (Simon-deckers 2008) .....	126
Figure 58 : Principe du dosage ELISA du TNF- $\alpha$ ( <a href="http://www.sinobiological.com">http://www.sinobiological.com</a> ) .....	127
Figure 59 : Principe du dosage de protéines par la technologie Luminex. A : Principe du dosage de protéines par la technologie Luminex : un test Elisa en suspension. B : Système de lecture BioPlex. Le laser rouge détermine l'adresse spectrale et donc l'identité de la bille et de sa protéine cible. Le laser vert quantifie la quantité de phycoérythrine et donc la quantité de protéine cible liée à la bille (Renner 2008) .....	130
Figure 60 : Les cytokines impliquées dans les réactions inflammatoires aiguës et chroniques. (Feghali & Wright 1997).....	131
Figure 61 : Cytokines inflammatoires du macrophage (Feghali & Wright 1997).....	132
Figure 62 : Principe du test des comètes (Monleau 2005) .....	134
Figure 63 : Lames 20 puits (Trevigen).....	134
Figure 64 : Représentation schématique d'un noyau sous la forme d'une comète, L : longueur de la comète, l : largeur de la comète, H : hauteur de la queue, + : anode, - : cathode (Larno 2002).....	136

Figure 65 : Différents niveaux de fragmentation de l'ADN observable par le test des comètes (Collins 2004; Monleau 2005) .....	137
Figure 66 : Observations microscopiques de particules de boehmite (MEB-FEG).....	145
Figure 67 : Distribution en taille par granulométrie laser des différentes particules de boehmite brute et après 2 min d'ultrasons .....	147
Figure 68: Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des différentes particules de boehmite dans l'eau .....	150
Figure 69 : Distribution en intensité du milieu de culture (DMEMc).....	151
Figure 70 : Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des différentes particules de boehmite dans le milieu de culture .....	152
Figure 71 : Courbes de potentiels zêtas des différentes particules de boehmite étudiées dans l'eau.....	156
Figure 72 : Dispersion de disperal à pH= 3,5 (distribution en intensité) .....	157
Figure 73 : Dispersion de disperal à pH= 6,9 (distribution en intensité) .....	158
Figure 74 : Dispersion de disperal à pH= 9,4 (distribution en intensité) .....	158
Figure 75: Taille des particules de disperal en fonction du pH dans l'eau .....	158
Figure 76 : Schéma du dispositif pour mesures avec l'impacteur en cascade .....	159
Figure 77 : Distribution normalisée en nombre et en surface de particules pour les différentes classes granulométriques.....	161
Figure 78 : Diffractogramme de rayons X des particules de disperal avant et après BET ....	162
Figure 79 : Diffractogramme de rayons X des particules de boehmite.....	164
Figure 80 : Concentration des impuretés des particules de boehmite industrielles exprimée en équivalent d'oxyde .....	166
Figure 81 : Solubilité de l'aluminium dans l'eau .....	168
Figure 82 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-OH]• obtenus en présence des particules industrielles de boehmite. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres HO• générés.....	169
Figure 83 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-COO]• obtenus en présence des particules industrielles de boehmite. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres COO• .....	169
Figure 84 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-OH]• obtenus en présence de quartz DQ12. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres HO• générés (Bouhmadi 2009).....	170
Figure 85 : Montage de récupération de la fraction fine des particules de boehmite .....	174
Figure 86 : Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des particules de boehmite disperal « dustiness » .....	175

Figure 87 : Distribution en taille par granulométrie laser des particules de bulky avant et après différentes conditions de broyage .....	176
Figure 88: Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des particules de boehmite « bulky » broyée.....	176
Figure 89 : Concentration des impuretés des particules de disperal et disperal « dustiness » exprimée en équivalent oxyde.....	178
Figure 90 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-OH]• obtenus en présence des particules industrielles de boehmite. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres HO• générés.....	178
Figure 91 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-COO]• obtenus en présence des particules industrielles de boehmite. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres COO• <sup>-</sup> .....	179
Figure 92 : Observations microscopiques de poudres de boehmite synthétisées (MEB-FEG) .....	182
Figure 93 : Images MET des échantillons de faible cristallinité (Ecole des Mines de Paris)	183
Figure 94 : Images MET des échantillons de cristallinité moyenne (Ecole des Mines de Paris) .....	184
Figure 95 : Images MET des échantillons de cristallinité forte (Ecole des Mines de Paris) .	185
Figure 96 : Distribution en taille par granulométrie laser des différentes particules de boehmite synthétisées brute et après 2 min d'ultrasons .....	187
Figure 97 : Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des différentes particules de boehmite dans l'eau (rouge) et après 1min d'ultrasons à 300W (vert) .....	190
Figure 98 : Diffractogramme de rayons X des particules de boehmite.....	193
Figure 99 : Concentration des impuretés des particules de boehmite synthétisées.....	194
Figure 100 : Contacts macrophages (RAW 264.7) et particules de boehmite (disperal) observés au microscope optique après coloration MGG (A, B) (respectivement x10, x60)) et au microscope électronique à balayage (C, D) (respectivement x850, x2300).....	204
Figure 101 : LDH libérée en pourcentage par rapport au témoin de cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)) .....	205
Figure 102 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, ****P<0,0001,	

***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)).....	206
Figure 103 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)).....	207
Figure 104 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3) ...	208
Figure 105 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))....	209
Figure 106 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3) .....	210
Figure 107 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose de particules en masse (Luminex) après 24h d'incubation .....	211
Figure 108 : Concentration d'IL-10 en pg/mL en fonction de la dose en masse de particules .....	212
Figure 109 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de la dose de particules brutes exprimée en masse après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)).....	213
Figure 110 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de la dose de particules brutes exprimée en surface après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	214
Figure 111 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))....	215



Figure 112 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose de particules brutes exprimée en masse après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)) .....	216
Figure 113 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)) .....	217
Figure 114 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de disperal par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir) .....	218
Figure 115 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de CAM9010 par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir) .....	219
Figure 116 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de CAM9015 par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir) .....	219
Figure 117 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de CAM9060 par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir) .....	220
Figure 118 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de V250 par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir) .....	220
Figure 119 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de bulky par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir) .....	221
Figure 120 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de disperal « dustiness » par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)..	221
Figure 121 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de bulky broyée par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	222
Figure 122 : (A) Photo en épifluorescence de noyaux (lignée RAW 264.7) après contact avec les témoins positifs et négatifs de toxicité (X60), (B) analyse des noyaux par le logiciel « Comet Assay IV, présence de particules de DQ12 au sein du noyau» .....	224
Figure 123 : Photo en épifluorescence d'un noyau « profil comète » (lignée RAW 264.7) après contact avec le témoin positif de toxicité (DQ12) (X60), analyse des noyaux par le logiciel « Comet Assay IV » .....	224
Figure 124 : Représentation de l'olive tail moment (OTM) en fonction de l'échantillon étudié .....	224
Figure 125 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in	

in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01,\*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)) ..... 227

Figure 126 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01,\*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)) ..... 228

Figure 127 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01,\*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)) ..... 229

Figure 128 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01,\*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)) ..... 230

Figure 129 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01,\*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))..... 231

Figure 130 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01,\*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)).... 232

Figure 131 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01,\*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))..... 233

Figure 132 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)).....	234
Figure 133 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 1 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	235
Figure 134 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 2 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	235
Figure 135 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 3 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	236
Figure 136 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 4 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	236
Figure 137 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 5 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	237
Figure 138 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 6 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	237
Figure 139 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 7 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	238
Figure 140 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 8 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir).....	238
Figure 141 : Photo d'un flacon en verre et d'une plaque de culture 96 puits .....	250
Figure 142 : Dégradation du TNF- $\alpha$ en fonction de la température (37°C et 4°C), en milieu acellulaire et sur un support en verre afin de limiter l'adsorption sur les parois. ....	251
Figure 143 : Evolution du $\Delta m$ de TNF- $\alpha$ au cours du temps en milieu acellulaire en fonction de la température (4°C et 37°C), et de la nature du support verre ou polystyrène.....	252

Figure 144 : Evolution du $\Delta m$ de TNF- $\alpha$ au cours du temps en fonction de la température (4°C or 37°C), de la nature du support (verre ou polystyrène) et de la présence ou non de nanoparticules de boehmite en milieu acellulaire .....	253
Figure 145 : Cinétique d'adsorption pour différents ratios, masse de TNF- $\alpha$ par masse de boehmite (0,78 - 1,56- 3,13- 6,25) .....	254
Figure 146 : Courbe de correction représentant le TNF- $\alpha$ adsorbé en fonction du TNF- $\alpha$ résiduel mesuré après 24h d'incubation .....	255
Figure 147 : Concentration en TNF- $\alpha$ en fonction d'une dose de boehmite en masse .....	256
Figure 148 : Concentration en TNF- $\alpha$ en fonction d'une dose de boehmite en masse après correction.....	257
Figure 149 : Principe de l'évaluation de l'activité biologique de particules de boehmite sur des macrophages (lignée RAW 264.7) (Bouhmadi 2009).....	262
Figure 150 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	293
Figure 151 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	294
Figure 152 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules « nanométriques » après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	294
Figure 153 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3) .....	295
Figure 154 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	296
Figure 155 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	297

Figure 156 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules « nanométriques » après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	297
Figure 157 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3) .....	298
Figure 158 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	299
Figure 159 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	300
Figure 160 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	301
Figure 161 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3) .....	302
Figure 162 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	302
Figure 163 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	303
Figure 164 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	304

Figure 165 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	304
Figure 166 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3) .....	305
Figure 167 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3) .....	306
Figure 168 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3) .....	306
Figure 169 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3) .....	307
Figure 170 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3).....	307
Figure 171 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7 après correction, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)) .....	308
Figure 172 : Concentration de TNF- $\alpha$ en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7 après correction, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3, ****P<0,0001, ***P<0,001, **P<0,01,*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules)).....	309







# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Applications visées par l'utilisation de nanomatériaux, entreprises concernées et estimation de la production mondiale actuelle (Afsset 2006).....	40
Tableau 2 : Conditions expérimentales des synthèses de boehmite.....	90
Tableau 3 : Concentrations environnementales en aluminium et estimation des apports journaliers chez l'homme (tableau constitué à partir des données IPCS 1997).....	93
Tableau 3 : Données issues de l'étalonnage de l'impacteur en cascade de l'EMSE (Dekati 2003).....	117
Tableau 5 : Récapitulatif des observations microscopiques.....	146
Tableau 6 : Granulométries des différentes particules de boehmite avant et après ultrasons	148
Tableau 7 : Granulométries des différentes particules de boehmite dans l'eau par spectroscopie de corrélation de photons.....	150
Tableau 8 : Granulométries des différentes particules de boehmite dans le milieu de culture DMEMc par spectroscopie de corrélation de photons .....	153
Tableau 9 : Point isoélectrique des particules et potentiel zêta dans l'eau et le DMEMc à pH 7 .....	154
Tableau 10 : Surface spécifique et taille des particules primaires .....	163
Tableau 11 : Tailles de cristallites déterminées par la méthode Debye Scherrer.....	165
Tableau 12 : Composition chimique des particules de boehmite.....	167
Tableau 13 : Récapitulatif des données physicochimiques des différentes particules industrielles de boehmite fournies par notre partenaire industriel .....	172
Tableau 14 : Données physicochimiques des particules de dispersal « dustiness » et de bulky broyée .....	177
Tableau 15 : Granulométries des différentes particules de boehmite avant et après ultrasons .....	187
Tableau 16 : Granulométries des différentes particules de boehmite dans l'eau par spectroscopie de corrélation de photons.....	190
Tableau 17 : Point isoélectrique des particules et potentiel zêta dans l'eau à pH 7.....	191
Tableau 18 : Surface spécifique des particules de boehmite synthétisées .....	192
Tableau 19 : Tailles de cristallites déterminées par la méthode de Debye Scherrer.....	193
Tableau 20 : Récapitulatif des données physico chimiques des différentes particules de boehmite synthétisées.....	196
Tableau 21 : Résumé de l'activité biologique des particules industrielles de boehmite.....	226

Tableau 22 : Résumé de l'activité biologique des particules industrielles de boehmite.....	240
Tableau 23 : Récapitulatif des différentes poudres étudiées .....	262
Tableau 24: Principales caractéristiques des différents types de particules de boehmite étudiés .....	264
Tableau 25 : Activité biologique globale des particules de boehmite.....	268

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMLV: Abelson Murine Leukemia Virus

BET: Brunnauer, Emmet, Teller

DLS: Dynamic Light Scattering

DMEM: Dubelcco's Modified Eagle Medium

DMEMc: Dubelcco's Modified Eagle Medium Complet

DMPO: 5-5'-dimethyl-1-pyrroline-Noxide

DRX: Diffraction des Rayons X

ELPI: Electrical Low Pressure Impactor

FVS: sérum de veau fœtal

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

ICP-AES : Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif

IFN: Interféron

IL : Interleukine

LDH : Lactate Déshydrogénase

MA : macrophages d'origine péritonéale

MGG: May-Grünwald Giemsa

MEB: Microscopie Electronique à Balayage

NP: Nanoparticule

OTM : Olive Tail Moment

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCS: Spectroscopie à Corrélation de Photons

PI : Point isoélectrique

PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate

PZ: Potentiel Zêta

ROS: Stress oxydant aigu

RPE: Résonance Paramagnétique Electronique

SCGE: Single cell gel electrophoresis

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor

TOX: Stress oxydant chronique

XPS: Spectroscopie de photoelectrons X





# INTRODUCTION

Les nanoparticules sont considérées comme des facteurs de risques potentiels pour la santé au travail. Bien que le risque sanitaire induit par les nanoparticules soit encore assez mal caractérisé, les nano-aérosols présents dans les ambiances industrielles correspondent déjà à de forts enjeux de prévention après les effets dévastateurs de l'exposition à l'amiante. En effet, les particules inhalées peuvent être responsables de pathologies pulmonaires : asbestose, cancer broncho-pulmonaire, mésothéliome de la plèvre ou digestives (Salmeron 2008) comme l'illustre le cas de l'amiante au siècle dernier. Depuis les nanotechnologies n'ont pas cessé d'être développées, cet essor entraîne de nombreuses inquiétudes dues au manque d'information sur leurs toxicités.

En effet lors des différentes étapes du procédé de synthèse des nanoparticules et du cycle de vie des produits (Figure 1), un risque d'inhalation de nanoparticules aérosolisées existe (Ostiguy 2006; G. Oberdorster et al. 2007). Les particules fines (diamètre inférieur à  $2,5\mu\text{m}$ ) et ultrafines (diamètre inférieur à  $0,1\mu\text{m}$ ) vont pouvoir ainsi pénétrer puis se déposer dans les différentes parties du tractus respiratoire. Les macrophages alvéolaires, présents au sein de l'appareil respiratoire, participent à la barrière défensive de l'organisme. Ces cellules ont une activité de phagocytose qui leur permet d'internaliser les nanoparticules étrangères afin de tenter de les éliminer notamment à l'aide de l'appareil mucociliaire et de la déglutition via le carrefour aéro-digestif. Au cours de ce processus biologique, les particules inhalées peuvent se révéler toxiques. Elles peuvent en effet engendrer des symptômes respiratoires, provoqués par une inflammation et pouvant conduire à un risque oncogène notamment lors d'exposition chronique (Günter Oberdörster 2002; Buzea et al. 2007; Warheit et al. 2008).

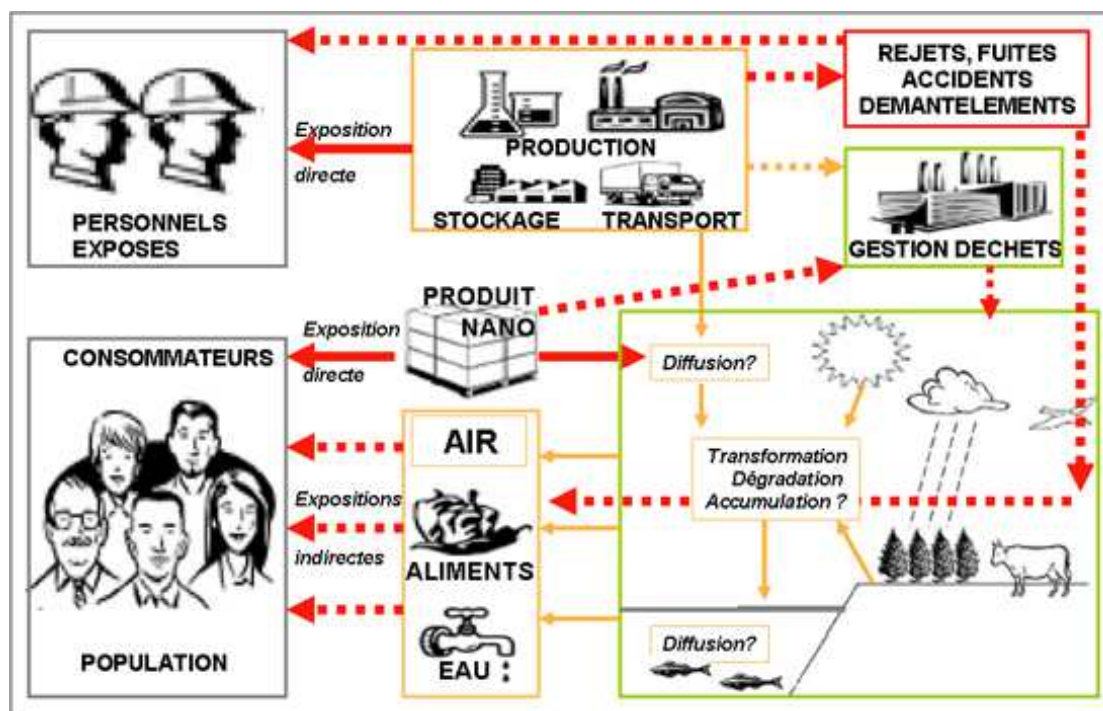


Figure 1: Cycle de vie et risque d'exposition (Extrait de [www.nanosmile.org](http://www.nanosmile.org))

En raison des risques potentiels encourus dans le cadre d'une exposition professionnelle, il est indispensable d'évaluer la toxicité des particules fines inhalées. Des études préliminaires montrent que les paramètres physico-chimiques des nanoparticules (composition chimique et structurale, propriétés de surface, caractéristiques morphologiques...) ont une grande influence sur l'activité biologique mesurée (Günter Oberdörster 2002; Buzea et al. 2007; Warheit et al. 2008). L'évaluation du risque a pour objectif de permettre de meilleures conditions d'hygiène et de sécurité dans les ambiances professionnelles et ainsi de limiter les impacts nocifs sur l'organisme.

En milieu professionnel, le risque est défini comme la probabilité qu'une personne subisse un préjudice ou des effets nocifs pour sa santé en cas d'exposition à un danger. Les risques sont exprimés sous forme d'éventualité ou de probabilité d'une maladie ou d'une blessure.

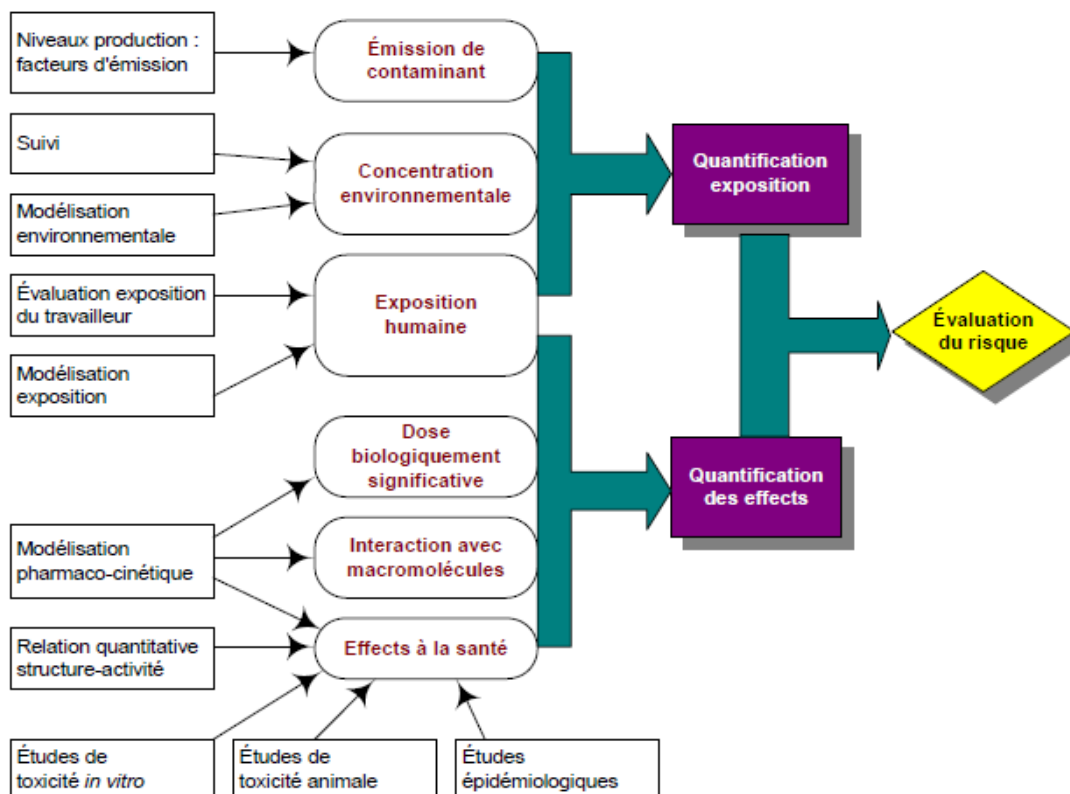
L'évaluation du risque suppose donc une bonne connaissance de l'identité du danger et de la toxicité des produits (relation dose-réponse), des niveaux d'exposition et de la caractérisation des dangers aux divers postes de travail. L'intégration de l'ensemble de ces informations et la comparaison des propriétés dangereuses et de la dose effective estimée à partir des niveaux d'exposition permet une évaluation du niveau de risque. En l'absence de données toxicologiques adéquates sur les nanoparticules, il demeure possible de documenter les risques connus pour la même substance de taille supérieure. Ceci devrait fournir des informations minimales sur la toxicité potentielle des nanoparticules mais cela demeure



insuffisant et non satisfaisant. La Figure 2 résume les informations et connaissances normalement nécessaires pour l'évaluation du risque.

Il est essentiel de rappeler que le risque n'est pas uniquement fonction de la toxicité d'un produit mais de la combinaison de la toxicité intrinsèque d'un produit et son exposition. Le risque peut donc s'exprimer par :

$$\text{Risque} = \text{Toxicité} \times \text{Exposition}$$



*Figure 2: Approche classique à l'évaluation du risque (Ostiguy 2010)*

L'exposition correspond à la mise en relation avec la source de danger (aérosols particuliers, polluants, etc). Elle dépend donc de plusieurs paramètres dont la voie d'entrée dans l'organisme, la fréquence et le degré d'exposition (Claude Ostiguy et Brigitte Roberge, 2008). Pour supprimer le risque il faut donc intervenir sur la toxicité ou l'exposition constituée par les particules en suspension au sein de l'environnement de travail.

Ces travaux font suite à la thèse de Najih Boumahdi soutenue en janvier 2009 visant à évaluer la toxicité du carbure de silicium (SiC). Ils sont réalisés en étroite collaboration avec un partenaire industriel afin d'évaluer la toxicité des nanomatériaux qu'ils utilisent.

Les nanoparticules étudiées lors de cette thèse sont des nanoparticules de boehmite. Ce matériau est un oxyhydroxyde de l'aluminium  $\text{AlO}(\text{OH})$ . Cet un précurseur de l'alumine- $\alpha$  et de l'alumine- $\gamma$ . Elle possède ainsi de nombreuses propriétés : mécanique, réfractaire, isolant ou optique. Au cours des différentes étapes de synthèse, des risques de suspensions de ces particules sont possibles et donc d'inhalation pour les employés de notre partenaire industriel. Ce pourquoi à titre indicatif il est important d'étudier la toxicité des nanoparticules de boehmite.

Ces travaux ont la particularité d'avoir été réalisée en collaboration entre l'Ecole des Mines de Saint Etienne (EMSE), la faculté de médecine de l'université Jean Monnet et le Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées (LINA). Ce dernier est un laboratoire interdisciplinaire mis en place depuis 2009 dans le cadre de l'IFR 143 (IFRESIS – Institut Fédératif de Recherche en Science Ingénierie et Santé). Il réunit, autour du thème des nanoparticules, les compétences en physique/chimie du solide de l'EMSE et les compétences médicales et biologiques variées des biologistes, médecins et chirurgiens de l'Université Jean Monnet et du Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne.

L'évaluation et la recherche en matière d'activité biologique des nanoparticules constituent la thématique transversale de l'équipe, en se focalisant sur les questions fondamentales de biodistribution, de biopersistance et de biotoxicité grâce à l'utilisation de nanoparticules industrielles ou synthétisées à façon à l'échelle du laboratoire (nanoparticules dites « modèles »).





# Chapitre I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



# SOMMAIRE

Chapitre I. Etude bibliographique	27
<b>I.1. Contexte de l'étude</b>	<b>31</b>
I.1.1. Le monde des nanotechnologies	31
I.1.2. Devenir des nanoparticules dans l'organisme	41
I.1.3. Nanotoxicologie	60
I.1.4. Etat de l'art sur la biotoxicité de la boehmite	73
I.1.5. Activité biologique	76
<b>I.2. Nanoparticules étudiées : la boehmite</b>	<b>83</b>
I.2.1. Boehmite	83
I.2.2. Procédés de synthèse	85
I.2.3. Solubilité de la boehmite	91
<b>I.3. Objectif de l'étude</b>	<b>96</b>





## **I.1.Contexte de l'étude**

### **I.1.1. Le monde des nanotechnologies**

#### **I.1.1.1. Définition et sources d'émission des nanoparticules**

Les nanoparticules sont des objets rencontrés de plus en plus couramment, employés dans des secteurs divers. Ces produits sont classés selon leurs différentes origines :

- Origine naturelle : provenant principalement des phénomènes de nucléation, des condensations de vapeurs dans l'atmosphère, des volcans (cendres) et des combustions de forêts.
- Origine anthropogéniques non-intentionnelle ou appelée aussi accidentelles issues des procédés chauds tels que le soudage des métaux ou encore la combustion des moteurs.
- Origine anthropogéniques intentionnelles qui sont directement manufacturés par l'homme sous forme de nanomatériaux.

Dans la figure 3 sont regroupées les différentes sources de nanoparticules.

Naturelles	Anthropogéniques	
	Non intentionnelles	Intentionnelles
Feux de forêts	Combustion des moteurs	Nanomatériaux manufacturés:
Cendres volcaniques	Incinérateurs	nanoparticules, nanotubes, nanofilms
	Fumés de métaux (soudage, etc)	Métaux, semi-conducteurs :
	Autres fumées	oxydes métalliques, carbone
	Friture, grillade	

**Figure 3: Principales sources de nanoparticules (G. Oberdorster et al. 2005)**

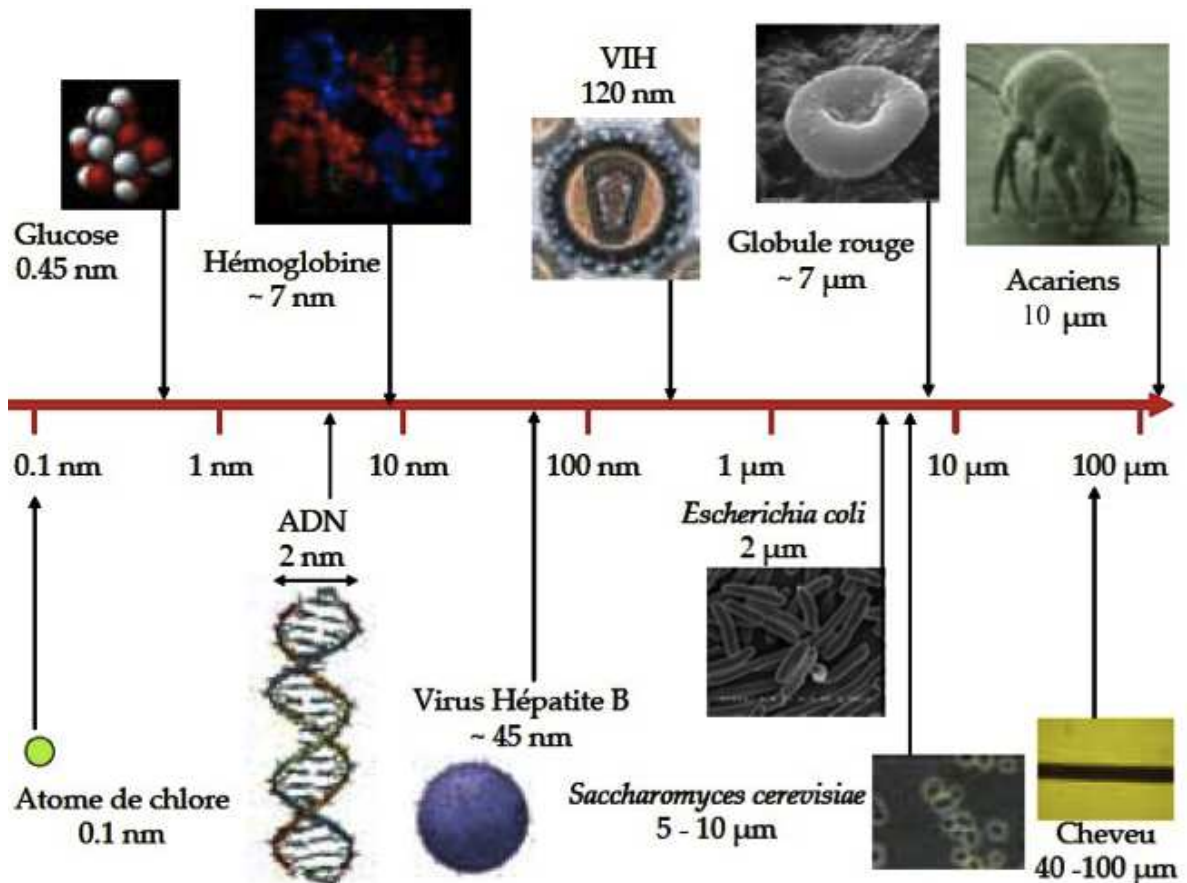


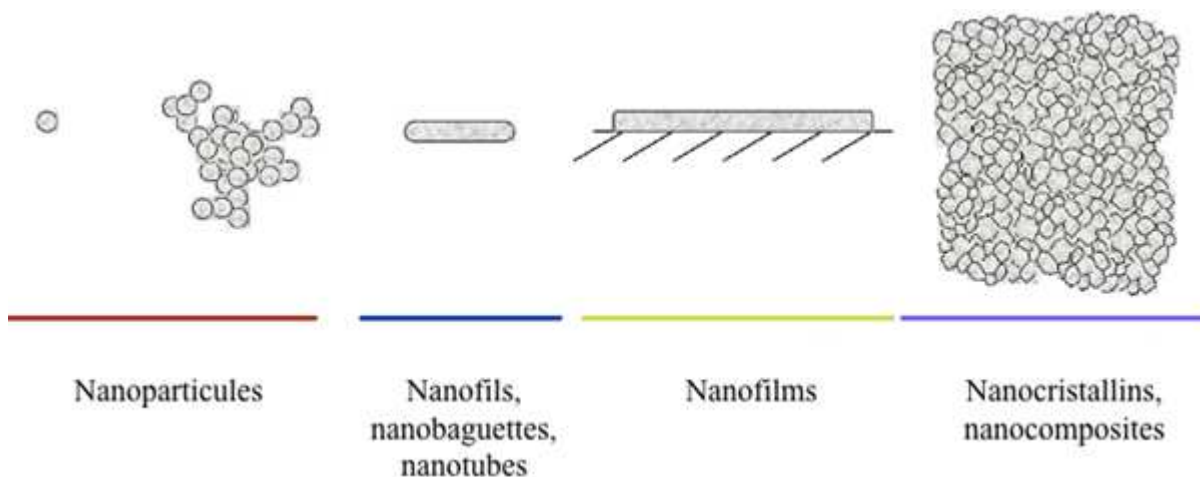
Figure 4: Exemples d'objets présents dans la nature dans une échelle de taille en nanomètres (Ibaseta 2007)

Le terme « nanoparticules » est utilisé pour des particules dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm (norme ISO TS/27687). Le rayon d'un atome étant de l'ordre du dixième de nanomètre (de 0,025 nm pour H à 0,26 nm pour Cs), une nanoparticule peut être composée de quelques dizaines à plusieurs centaines d'atomes (environ 500 atomes pour le silicium par exemple). Les nano-objets sont distingués selon leurs dimensions (Cao 2004; Afsset 2006) (Figure 5):

- aucune dimension nano: matériaux tels que les nanocomposites (composites renforcés avec des nano-objets (exemple : avec des nanotubes)), ou les solides nanocristallins : solide macroscopique constitué de nanocristaux.
- une dimension nano : matériaux avec une dimension à l'échelle nanométrique typique des films et des revêtements de surface. Les revêtements ont été utilisés pendant des décennies dans divers champs comme l'électronique, la chimie.
- deux dimensions nano : matériaux avec deux dimensions à l'échelle nanométrique par exemple les nanofibres, les nanotubes, les nanofilaments et nanobâtonnets (nanotubes de carbone, nanofibres de SiC, nanotubes de bore...). Ils ont donc une de leurs trois

dimensions supérieures à 100 nm : un diamètre de 1 à quelques nanomètres et une longueur de 500 nm à 10  $\mu\text{m}$ .

- trois dimensions nanométriques : le matériau est nanométrique dans les trois directions de l'espace, et n'a en conséquence aucune dimension micro ou macrométrique (particules manufacturées ou issues de procédés industriels).



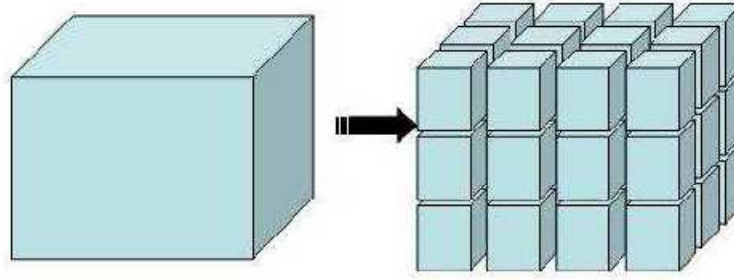
**Figure 5: Schéma représentant les différents types de nanoparticules (Ibaseta 2007)**

Les nanoparticules peuvent donc avoir des formes très diverses (sphériques, fibreuses, tubulaires et planes) et nous verrons ultérieurement que la morphologie est un paramètre important pour expliquer l'activité biologique des particules.

#### 1.1.1.2. Modification des propriétés des solides divisés à l'échelle nanométrique

Il a été montré dans de précédentes études toxicologiques expérimentales *in vivo* et *in vitro* sur des particules fibreuses et sphériques de taille micrométrique que les particules fibreuses naturelles, comme l'amiante, sont associées à des effets cytotoxiques et génotoxiques qui entraînent dans le cadre d'une exposition prolongée un risque accru de pathologies inflammatoires et cancéreuses comme des fibroses pulmonaires et de cancers broncho-pulmonaires (Stanton et al. 1977).

Dans le cas des nanoparticules, leur très petite taille leur confère des propriétés remarquables avec notamment une surface spécifique très importante.

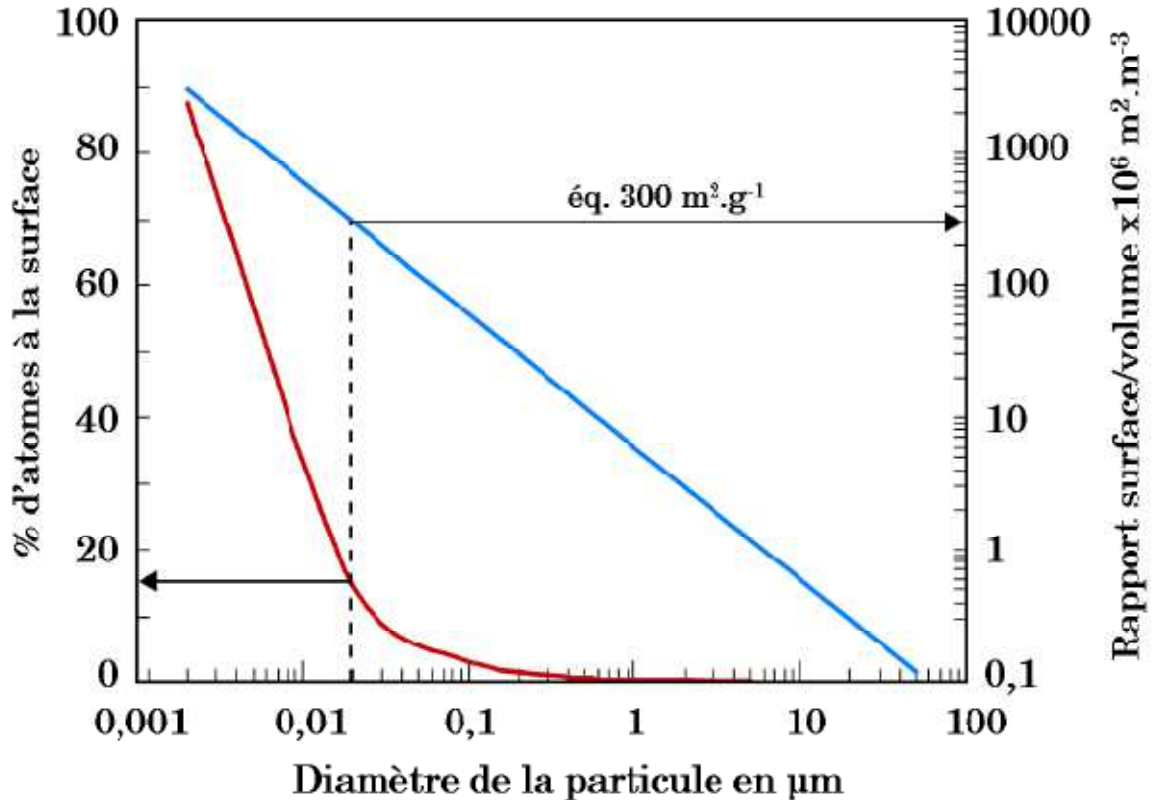


**Figure 6: Schéma représentant la relation entre taille et surface spécifique (Zeyons 2008)**

Une microparticule cubique d'un micromètre de côté possède une surface de  $6\mu\text{m}^2$ , si on estime que cette microparticule est composée de nanoparticules de 1nm de côté alors elle aura un volume de  $10^9\text{ nm}^3$  et une surface cumulée de toutes les nanoparticules de  $6.10^9\mu\text{m}^2$ . Donc à volume égal, la surface spécifique des nanoparticules est  $10^3$  fois plus grande que celle d'une microparticule (Figure 6). Avec cette gamme de taille, la principale caractéristique conférée aux nanoparticules est un rapport surface / volume très élevé.

Comme le montre la figure 7, plus la taille d'une particule diminue plus le nombre d'atomes se trouvant en surface augmente. Cette importante fraction d'atomes en surface va avoir pour conséquence de modifier significativement les propriétés atomiques, électroniques, physico-chimiques, optiques et également la réactivité des nanomatériaux par rapport aux mêmes matériaux mais de taille micrométrique.

Ainsi ces deux caractéristiques confèrent de nouvelles propriétés aux nanoparticules.



*Figure 7: Evolution du rapport surface/volume (en bleu) et de la fraction d'atomes présents à la surface de la particule (en rouge) en fonction du diamètre de la particule (Witschger O., Fabries J-F. 2005; Simon-deckers 2008)*

D'après la figure 7, pour un diamètre de particule de 0,02  $\mu\text{m}$ , environ 15% des molécules sont situées en surface et le rapport surface/volume est de l'ordre de  $3 \cdot 10^8 \text{m}^2/\text{m}^3$  (équivalent à une surface spécifique de  $300 \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour une masse volumique de  $1 \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ).

Cette figure montre que les deux facteurs considérés augmentent de façon significative lorsque le diamètre de la particule diminue, en particulier en dessous de 100 nm. Lorsque le diamètre décroît de 500 à 5 nm, la proportion de molécules à la surface passe de moins de 1% à près de 50% (Witschger O., Fabries J-F. 2005).

Les nanoparticules possèdent un réel intérêt industriel et économique au vu des nombreuses propriétés remarquables qu'elles présentent (Figure 8):

- Les premières suspensions de nanoparticules étudiées scientifiquement sont attribuées à Faraday (1847). Il établit le lien entre les couleurs (doré, bleu, noir ou encore rouge vif) de solutions de particules d'or (appelées « sols » d'or) et leur taille. Cette propriété était depuis longtemps exploitée pour donner leurs couleurs vives aux vitraux.

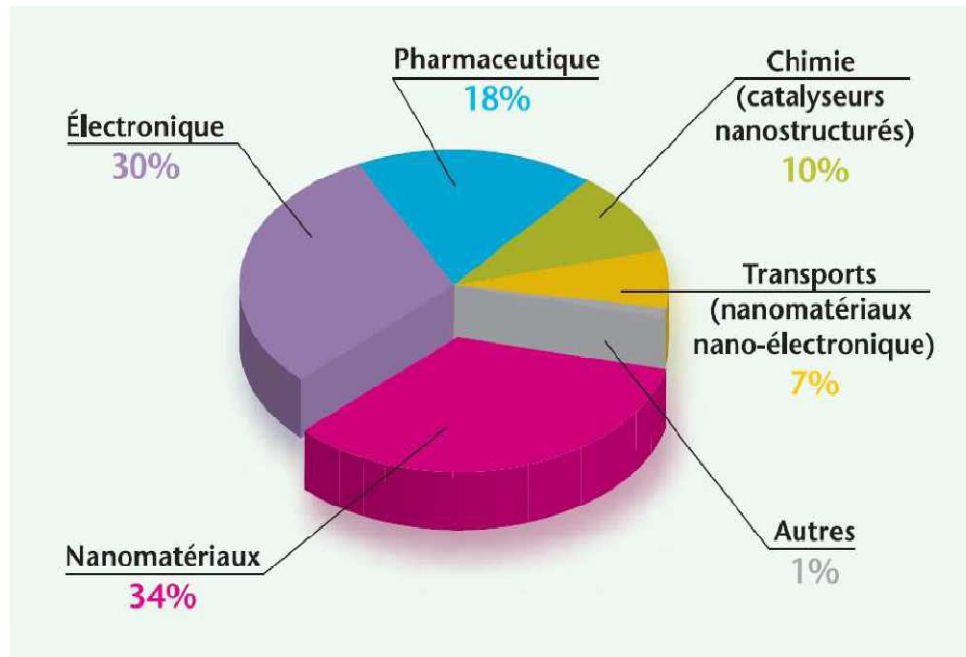
- Optiques : Certaines nanoparticules d'oxydes métalliques ont la capacité d'adsorber dans les UV comme par exemple l'oxyde de zinc (ZnO) et le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) qui sont utilisées dans les produits cosmétiques (crèmes solaires) car elles représentent une bonne protection contre les UV tout en ayant l'avantage d'être transparents dans le visible.
- Electriques : L'ajout de nanotubes de carbone (NtC) à des matrices composites comme Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, (Zhan et al. 2003) augmente par exemple très significativement la conductivité du matériau. Ces propriétés électriques, dues à la proximité de leurs niveaux d'énergie occupés et vacants (confinement quantique), font des nanoparticules des candidates idéales pour la photocatalyse (Kamat 2002). C'est par exemple le cas pour les nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, elles sont incorporées à des surfaces pour leur donner des qualités «autonettoyantes». Des industries très variées les emploient à ces fins aussi bien dans le bâtiment que le textile (Qi et al. 2006; Vigneshwaran et al. 2006; Chattopadhyay & Patel 2011). Les NtC possèdent des propriétés électriques très intéressantes: selon leur hélicité, les NtC peuvent être conducteurs ou semi-conducteurs. Ils sont aussi capables d'émettre des électrons lorsqu'on les soumet à un champ électrique, et cet effet est d'autant plus important que le NtC est long et fin (A. K. Jain et al. 2007).
- Mécaniques : Les propriétés s'étendent de la superplasticité (ex : matériau constitué de cuivre nanocristallin, (L. Lu et al. 2000) à des résistances décuplées (ex : renforcement de matrices par des nanotubes de carbone). En effet, la dureté de NtC multiparois peut atteindre celle du diamant.
- Biologique : La petite taille des nanoparticules leur permet d'interagir de façon particulière avec les systèmes biologiques (protéines, membranes, cellules). L'utilisation des nanoparticules à des fins thérapeutiques a été envisagée il y a déjà une vingtaine d'années et continue de susciter des recherches actives dans ce domaine notamment dans la libération contrôlée de médicaments (Couvreur & Puisieux 1993; Moghimi et al. 2005) ou l'amélioration des techniques d'imagerie médicale. On parle alors de nanomédecine. Cependant, une utilisation courante des nanoparticules pour des applications de diagnostic, d'imagerie, voire curatives ne sera envisageable qu'une fois que la toxicité des nanoparticules aura été vérifiée en amont.

Propriétés	Exemples
<b>Catalytique</b>	Efficacité catalytique élevée due au rapport surface/volume élevé
<b>Electrique</b>	Augmentation de la conductivité électrique des céramiques et des nanocomposites magnétiques Augmentation de la résistance électrique des métaux
<b>Magnétique</b>	Augmentation de la coercivité magnétique, comportement superparamagnétique
<b>Mécanique</b>	Augmentation de la dureté et de la solidité des métaux et des alliages, de la ductilité et de la superélasticité des céramiques
<b>Optique</b>	Changement spectral de l'absorption optique et des propriétés fluorescentes, augmentation de l'efficacité quantique des cristaux semi conducteurs
<b>Stérique</b>	Augmentation de la sélectivité Sphères creuses pour un transport spécifique de médicaments et une distribution contrôlée
<b>Biologique</b>	Augmentation de la perméabilité vis-à-vis des barrières biologiques (membrane, barrière épithéliale,...), augmentation de la biocompatibilité

*Figure 8: Récapitulatif des changements de propriétés des particules à l'échelle nanométrique (Luther, 2004)*

#### 1.1.1.3. Les domaines d'applications des nanotechnologies

Le marché des nanotechnologies ne cesse de grandir depuis les années 90. Les nanoparticules possèdent de nombreuses propriétés qui peuvent donc conduire à un large domaine d'applications industrielles. En 2010, l'impact économique et industriel des nanotechnologies se répartit sur trois grands secteurs: électronique, pharmaceutique et les nanomatériaux (Figure 9).



**Figure 9: Répartition en pourcent de l'impact économique global des nanotechnologies en 2010 (INERIS 2007)**

De nombreux secteurs voient les nanomatériaux se développer (Afsset 2006) :

- Electronique et communication : mémoires à haute densité et processeurs miniaturisés, nouvelles cellules solaires, batteries et cellules à combustion, des composantes digitales logiques, des écrans plats à éclairage brillant, un couplage silice/substances organiques.
- Pharmaceutique: développement d'agents antimicrobiens, de marqueurs biologiques pour la recherche et le diagnostic, de procédés de séparation biomagnétiques, des vecteurs d'administration de médicaments, des milieux de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique, des dispositifs orthopédiques et des écrans de protection solaire, délivrance des médicaments sur-mesure uniquement à des organes précis. En ce qui concerne les soins de santé, les nanomatériaux permettront de réaliser des moyens de diagnostic miniaturisés implantés afin d'obtenir des diagnostics précoces, en chirurgie, d'améliorer l'ingénierie tissulaire et les implants avec des revêtements améliorant la biocompatibilité et la bioactivité, l'analyse d'ADN, la construction d'appareils d'ultraprécision, des systèmes d'analyse et de positionnement, de meilleurs systèmes optiques, des biopuces à haute densité, la biodétection de pathogènes, la détection de protéines...
- Chimie et matériaux : développement de nanocomposites à matrice polymère, élargissement des domaines d'application des polymères et amélioration de certaines propriétés (allègement et renforcement des structures, amélioration des propriétés



optiques, augmentation de la durabilité, mais également résistance au feu, aux températures élevées et aux chocs thermiques). Le but est d'obtenir des céramiques, pigments, poudres et catalyseurs multifonctionnels et plus efficaces, des technologies de collage sans colle, de nouvelles technologies de soudage, des couches fonctionnelles (anti-adhésif, antistatique, etc.), des peintures, vitres et vêtements photo-actifs et autonettoyants, etc.

- Transport: réduire le poids des véhicules, augmenter la résistance des pièces automobiles (rayures), augmenter la tenue à la température de certaines pièces, diminuer la consommation d'énergie, limiter les émissions de gaz à effet de serre et augmenter la sécurité et le confort des passagers. Aéronautique et spatial : améliorer la performance et diminuer le poids des matériaux, augmenter la durée de vie, diminuer la consommation et améliorer la performance des moteurs.
- Autres :
  - Environnement : utilisation des nanomatériaux pour la réduction des émissions de polluants, le traitement des effluents (photocatalyse et purification des gaz), la production d'eau ultrapure à partir d'eau de mer...
  - Energie : amélioration des performances des systèmes énergétiques, développement d'énergie propres, économies d'énergie, développement de matériaux pour le stockage de l'hydrogène, cellules photovoltaïques, éclairage plus économique, matériaux isolants plus efficaces...
  - Cosmétiques : améliorer les propriétés des produits cosmétiques telles que la tenue, la transparence, la brillance et les propriétés optiques (filtration des rayonnements ultraviolets, tenue des crèmes solaires à l'eau, adaptation à l'environnement par effet photochromique, nouveaux effets visuels, anti-vieillessement de la peau.
  - Alimentaire : revêtement imperméable, membranes pour le traitement des liquides alimentaires, marquage pour la traçabilité

Le Tableau 1 ci-dessous rassemble pour différents secteurs d'activité, les applications visées par l'utilisation des nanomatériaux et le nom de quelques entreprises concernées.

Secteurs	Applications visées	Fabricants-Utilisateurs	Production (2010)
<b>Agro-alimentaire</b>	Revêtement imperméable		
	Membranes pour le traitement de liquides alimentaires	Laiteries, vins	
	Marquage pour la traçabilité		
<b>Automobile</b>	Revêtement auto-lubrifiant, anti-rayure et anticorrosion	Rhodia, Michelin, Saint Gobain, Hutchinson	Oxydes de Ce, Ti
	Pneu vert, Pot catalytique		Nanotube de C
	Vitrage autonettoyant, hydrophobe, athermique	Renault, Arcelor	
<b>Chimie</b>	Catalyseur pour chimie sélective	Rhodia, Arkéma	
	Photocatalyse pour production de H <sub>2</sub>		
<b>Cosmétiques</b>	Anti-UV, anti-vieillessement	L'oréal, BASF	Oxydes de Ti, Zn, Fe <b>10<sup>3</sup>t/an</b>
	Antibactérien	DGTec	
<b>Electronique</b>	Matériau isolant	Alliance, Croles	Nanotubes de C, oxydes de Ti, Zn, Fe, Ce <b>10<sup>2</sup>t/an</b>
	Polissage de wafers et disques durs	Baikowski	
	Polymère nanostructuré pour électronique souple	Arkéma, iNanov	
<b>Energie</b>	Pile à combustible, Eclairage à basse consommation	Toshiba, Arkéma, DGTec, Kodak, Phillips	
	Allègement de structure pour éolien		
	Cristaux photoniques pour panneaux solaires		
<b>Environnement</b>	Traitement de pollutions	Orelis TAMI, Suez	Oxydes d'Al, Fe <b>10<sup>2</sup>t/an</b>
	Traitement de l'eau potable		
<b>Santé, pharmacie</b>	Délivrance ciblée de médicaments	Arkéma	nC60, quantum dots, oxyde de Fe <b>1t/an</b>
	Réparation et implants	Biometrix, DGTec	
<b>Textile, habillement</b>	Antibactérien, retard au feu, filtres UV et IR	DGTec, Rhodia	
	Tissu indéfroissable et antisalissure	Nano-Tex	

**Tableau 1: Applications visées par l'utilisation de nanomatériaux, entreprises concernées et estimation de la production mondiale actuelle(Afsset 2006)**

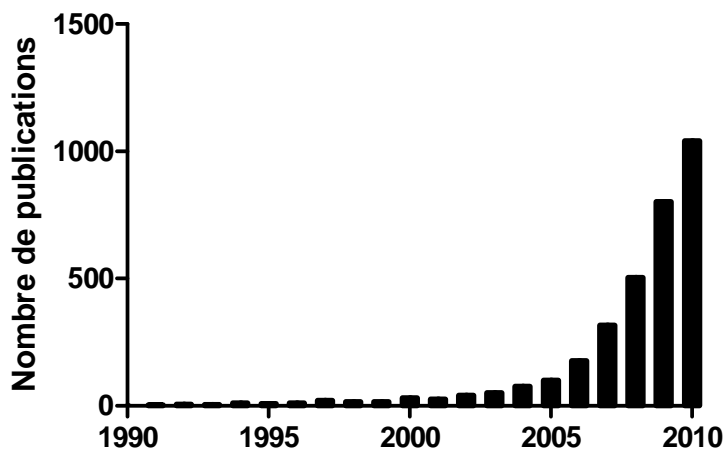
La production industrielle française de nanomatériaux en 2008 au niveau national, d'après un bilan de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET, devenue entre temps l'ANSES pour Agence nationale de sécurité sanitaire), s'appuyant également sur une étude antérieure de l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS) est de :

- Près 485 000 tonnes de silice par environ 1300 opérateurs,
- 469 000 tonnes d'alumine par près de 1000 opérateurs,
- 300 000 tonnes de carbonate de calcium,
- 240 000 tonnes de noir de carbone par 280 opérateurs,

- 250 000 tonnes de dioxyde de titane sous forme submicronique et 10 000 tonnes sous forme de nanoparticules impliquant 270 opérateurs,
- La capacité de production française annuelle de nanotubes de carbone est de 10 tonnes impliquant 10 opérateurs (Gaffet 2011).

### **I.1.2. Devenir des nanoparticules dans l'organisme**

L'intérêt croissant des nanomatériaux, ainsi que leur production en forte augmentation, ont conduit à de nombreuses études sur la toxicologie des nanoparticules. En effet le nombre de publications était de 1 en 1990 et est passé à plus de 1000 en l'espace de seulement 30 ans (Figure 10). En ce qui concerne la toxicité de la boehmite, nous recensons seulement deux publications (Pauluhn 2009; Pauluhn 2011).



*Figure 10: Evolution du nombre de publications annuelles contenant le groupe de mots «toxicité des nanoparticules» (Science Direct)*

Dans cette partie, nous présentons donc quelques éléments sur la toxicologie des nanoparticules.

Les effets toxiques des nanoparticules sont abordés en fonction de la voie d'entrée de celles-ci dans l'organisme : par inhalation, par ingestion, par voie dermique et par voie intraveineuse. Cette dernière ne sera pas abordée dans notre cas car elle implique essentiellement une entrée volontaire et non subie des nanoparticules dans l'organisme (par exemple pour des applications médicales).

### 1.1.2.1. Voies d'entrée dans l'organisme

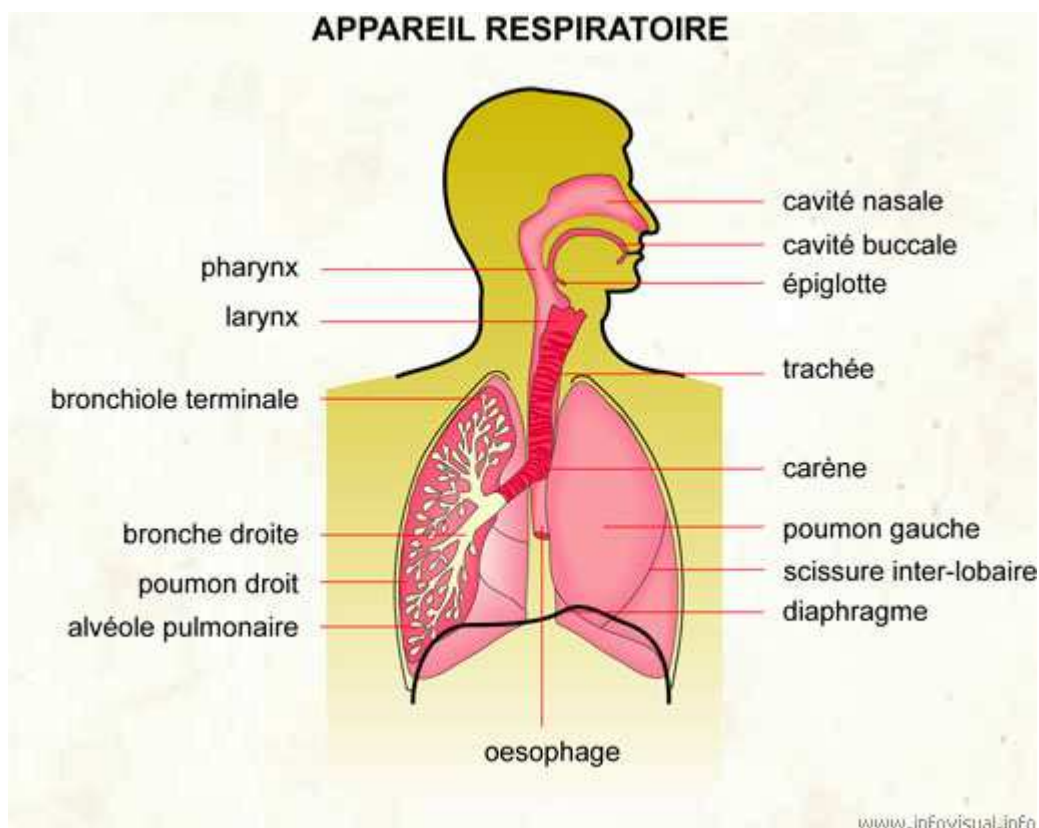
L'homme peut entrer en contact de différentes manières avec les nanoparticules (Hervé-Bazin & Collectif 2007). La voie respiratoire est la voie la plus importante et par conséquent la voie la plus étudiée.

#### 1.1.2.1.1. *Voie respiratoire*

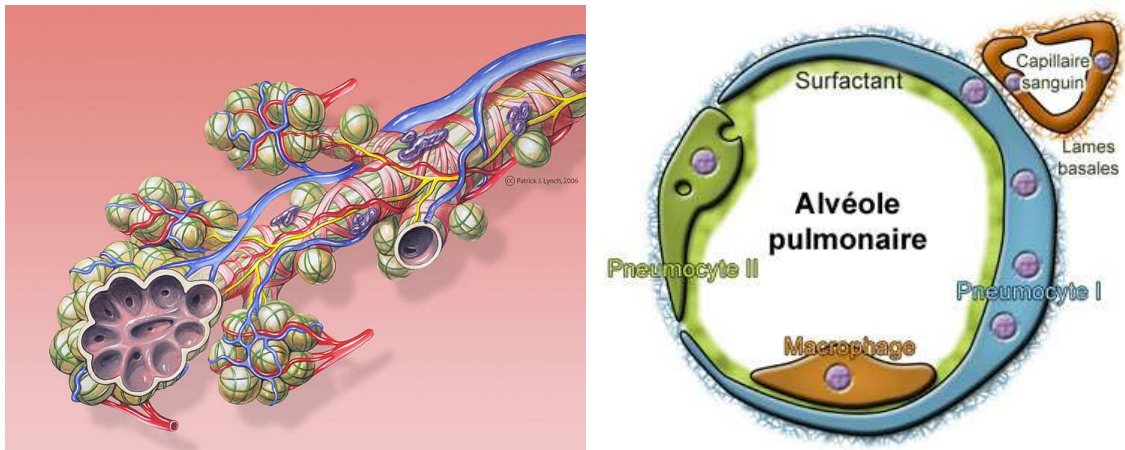
##### **Définition des voies respiratoires**

Les particules peuvent pénétrer par le nez ou par la bouche à l'intérieur du tractus respiratoire qui se compose schématiquement de trois parties (Figure 11):

- Les voies aériennes supérieures comprenant la bouche, le nez, le pharynx et le larynx.
- L'arbre trachéobronchique allant de la trachée aux bronches puis bronchioles.
- Le parenchyme pulmonaire comprenant les bronchioles terminales, les alvéoles et surtout la barrière alvéolo-capillaire.



*Figure 11: Schéma de l'appareil respiratoire (www.infovisual.info)*

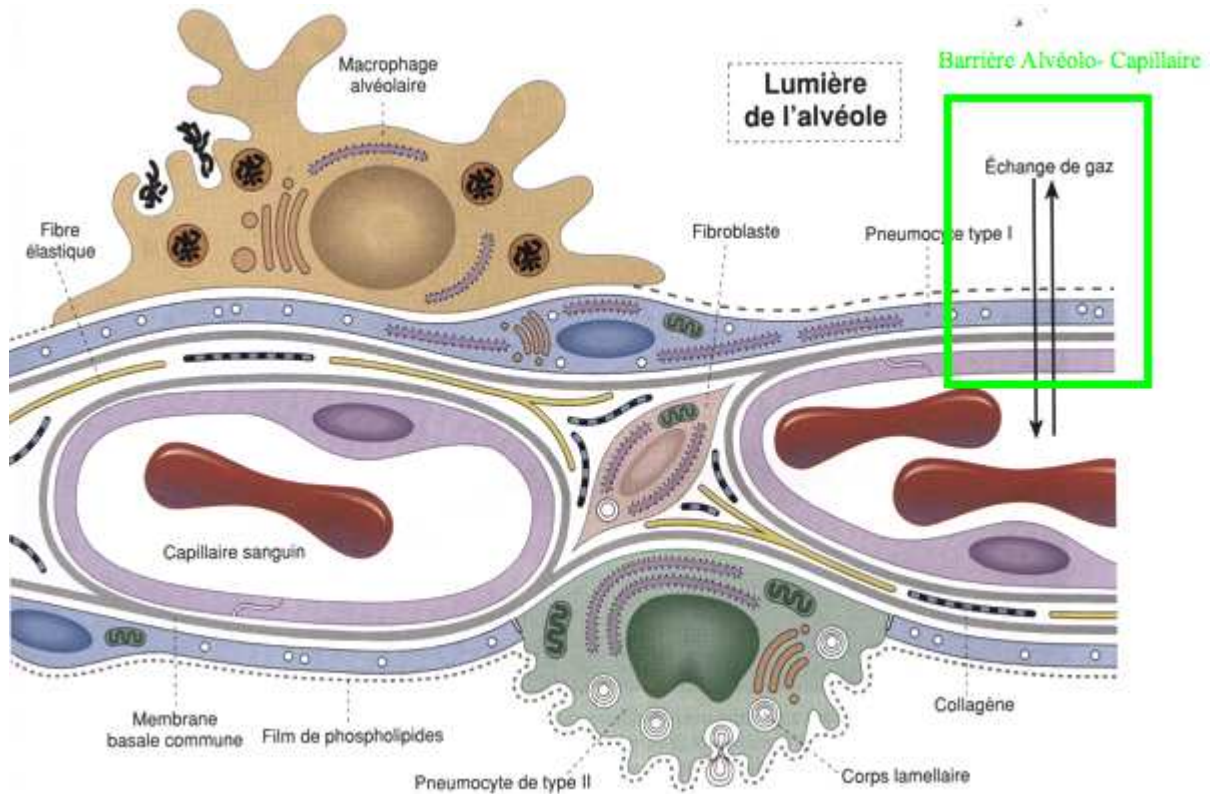


**Figure 12: Schéma et coupe transversale d'une terminaison bronchiale et d'un alvéole**  
(<http://fr.wikipedia.org>)

#### Arbre trachéobronchique

Au niveau de l'arbre trachéobronchique a lieu la clairance mucociliaire. C'est le mécanisme par lequel les particules inhalées, de taille trop importante pour être absorbées par la voie pulmonaire, sont absorbées par la voie digestive. Ainsi, les particules ayant un diamètre de deux à cinq  $\mu\text{m}$  qui sont déposées dans la région trachéobronchique sont propulsées vers la bouche, par l'action combinée du mucus et des cils de la muqueuse respiratoire. Elles sont ensuite avalées et peuvent être absorbées par la voie digestive. Les particules peuvent aussi être exhalées par mouchage ou éternuement.

Le parenchyme pulmonaire



*Figure 13: Coupe du parenchyme pulmonaire (Welsch 2004)*

Les alvéoles (Figure 12) sont les derniers éléments de l'appareil respiratoire et correspondent à des petits sacs arrondis de 200 $\mu$ m de diamètre à paroi élastique permettant une adaptation aux mouvements respiratoires. Les derniers éléments de l'appareil respiratoire sont appelés sacspulmonaires ou vésicules pulmonaires dans lesquels se produisent les échanges gazeux. Ils ont comme fonction principale l'hématose (transformation du sang pauvre en dioxygène et riche en dioxyde de carbone en sang réoxygéné au niveau des poumons). Cette fonction se déroule précisément au niveau de la barrière alvéolo-capillaire (Figures 13 et 14).

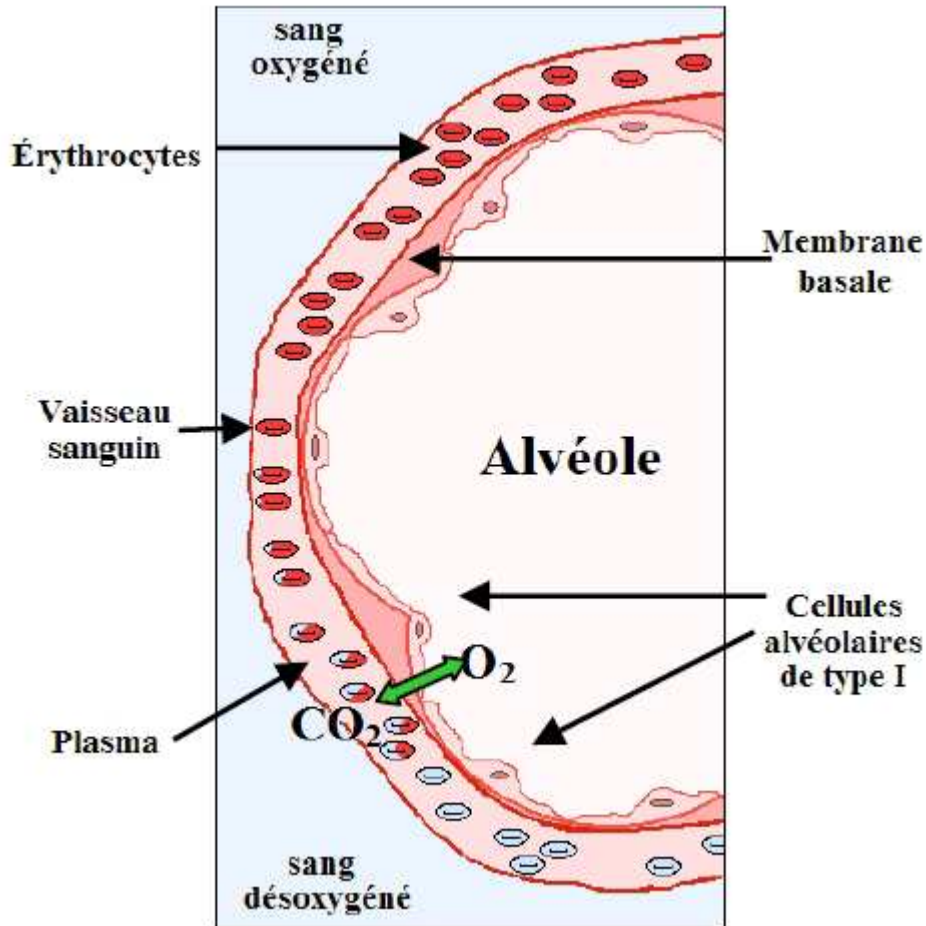


Figure 14: Schéma de la barrière alvéolo-capillaire(Nguyen 2009)

Il s'agit d'une zone fonctionnelle spécifique de la paroi inter-alvéolaire composée de 4 structures : le surfactant, le voile cytoplasmique du pneumocyte I, l'endothélium capillaire et la lame basale fusionnée des cellules endothéliales et épithéliales. Il s'agit d'une zone fonctionnelle particulièrement fine de l'ordre de  $0,2 \mu\text{m}$  qui représente environ 30% de la surface alvéolaire ( $130\text{m}^2$ ), pour comparaison, le diamètre des globules rouges est de  $7 \mu\text{m}$ . Ceci permet aux alvéoles d'assurer leur rôle, qui est de transmettre l'oxygène au sang et d'en extraire le dioxyde de carbone.

À ce niveau se trouvent deux types de cellules épithéliales alvéolaires : les pneumocytes I composant la barrière alvéolo-capillaire et les pneumocytes II qui sécrètent le surfactant (film endoalvéolaire protecteur permettant de résister à la pression des gaz notamment). La présence de ce dernier est donc essentielle, dans la mesure où il permet de diminuer la tension superficielle en permettant ainsi une distension pulmonaire plus facile.

Au niveau alvéolaire il n'y a plus d'appareil mucociliaire mais un épithélium alvéolaire avec les pneumocytes et les macrophages alvéolaires libres à la surface. Ce sont eux qui peuvent capter les particules et soient elles sont remontées en amont du tractus respiratoire,

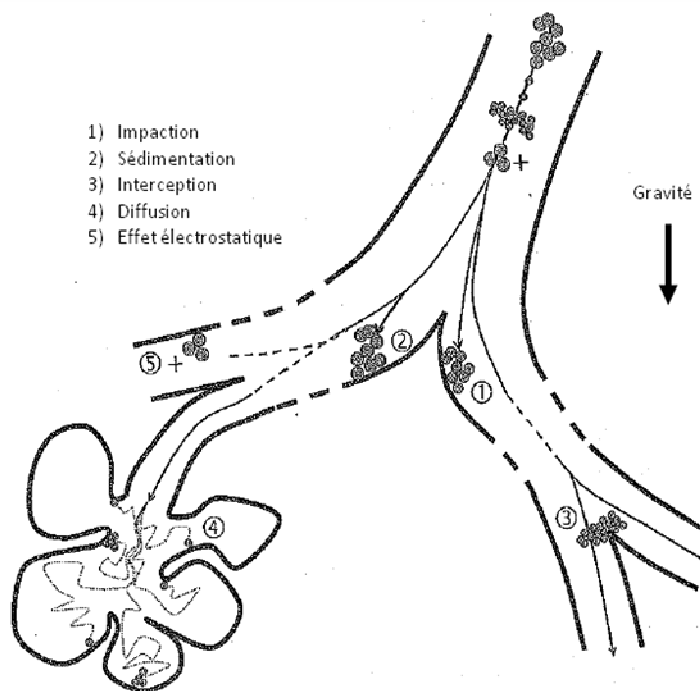
soit elles migrent dans l'interstitium conjonctif pour gagner les vaisseaux lymphatiques et activer des lymphocytes.

#### Devenir des particules inhalées

Seule une fraction des particules initialement inhalées va pouvoir se déposer dans les différentes parties du tractus respiratoire. Différents mécanismes interviennent lors du dépôt des nanoparticules (Figure 15):

- L'impaction : phénomène lié à l'inertie des particules. Lors d'un changement de direction dans le mouvement du fluide, les particules rencontrent un obstacle et ne peuvent donc suivre fidèlement l'écoulement de l'air. Cet effet est plus important pour les plus grosses particules.
- La sédimentation : action de la gravité sur les particules, cet effet augmente avec la taille, la densité de la particule et la durée de résidence des particules dans les voies respiratoires.
- L'interception : elle se produit lorsque l'extrémité d'une particule, sans se dévier de la trajectoire du fluide, entre en contact avec la paroi d'un conduit où elle se dépose. Ce phénomène peut être significatif pour les particules de formes allongées comme les fibres ou les agglomérats de particules mais négligeable dans le cas de particules sphériques.
- La diffusion : celui-ci est dû au mouvement brownien des particules, mouvement aléatoire causé par le choc des molécules de l'air sur des particules. Ce mécanisme est prédominant pour les particules inférieures à environ 200-300nm.
- Les effets électrostatiques : ceux-ci apparaissent lorsque les particules sont fortement chargées, elles induisent alors une charge de signe contraire sur les voies aériennes, et se sentent donc attirées par celles-ci, tout en étant soumises à une répulsion avec les particules voisines (dans le cas où celles-ci ont des charges du même signe).



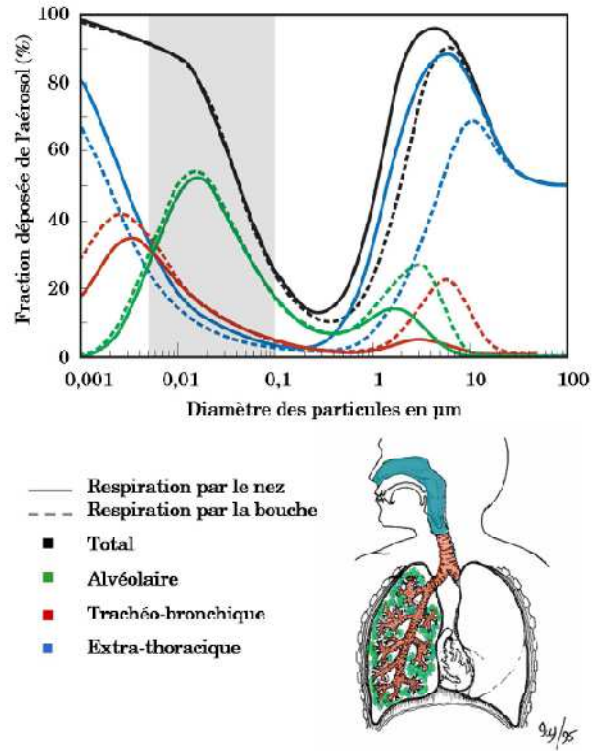


**Figure 15: Illustration des différents mécanismes de dépôts des particules inhalées dans les voies respiratoires (Hervé-Bazin & Collectif 2007)**

Selon un modèle développé et publié en 1994 par la Commission Internationale de Protection Radiobiologique (CIPR, publication 66 1994) et s'appliquant aux particules inhalées sous forme de particules bien individualisées à une taille déterminée et non sous formes d'agrégats, le dépôt des nanoparticules inhalées dans le tractus respiratoire dépendrait essentiellement de leur diamètre aérodynamique, ce qui pourrait avoir des conséquences sur leurs effets potentiels. Ce modèle est le plus reconnu dans le domaine de l'évaluation des doses de radioprotection et est repris comme modèle de référence dans la bibliographie pour la nanotoxicologie (G. Oberdorster et al. 1994).

La Figure 16 montre le pourcentage de particules déposées dans chacune des trois régions.

Les particules de 1 à 10  $\mu\text{m}$  ont un comportement inertiel assez important ; elles vont se déposer dans les différentes parties du tractus respiratoire en fonction de leur taille par impaction dans les voies aériennes supérieures (fosses nasales et cavité buccale). Ce comportement inertiel augmente avec la taille des particules mais au-dessus de 10  $\mu\text{m}$  la taille devient trop grande et les particules commencent à être exhalées.



**Figure 16: Pourcentage des particules déposées dans l'ensemble de l'appareil respiratoire et dans les différentes régions en fonction de la taille (Witschger O., Fabries J-F. 2005)**

Les particules dont le diamètre aérodynamique est de 10 à 100 nm se déposent principalement dans la région alvéolaire. Les particules de moins de 10 nm quant à elles vont se déposer par diffusion dans les différentes parties du tractus respiratoire. Nous constatons aussi que les particules (diamètre aérodynamique) de 200 à 500 nm ne se déposent que très peu dans les voies respiratoires car aucun mécanisme ne s'applique sur cette gamme de taille. Les particules sont alors inhalées puis exhalées sans qu'elles ne se déposent dans chacune des trois régions du tractus respiratoire.

Le dépôt des particules est donc dépendante du diamètre aérodynamique, de la densité de celles-ci mais aussi des facteurs inter individuels : du sexe de l'individu, de son âge, de l'activité qu'il est en train de réaliser et de sa façon de respirer. En effet nous constatons sur la Figure 16 que les résultats sont différents si les particules sont respirées par le nez ou par la bouche (Brown et al. 2002; G. Oberdorster et al. 2005; Witschger O., Fabries J-F. 2005).

#### 1.1.2.1.2. Voie digestive

Les nanoparticules peuvent pénétrer de deux façons différentes à l'intérieur du tube digestif. L'ingestion involontaire des nanoparticules peut avoir lieu lorsque le mucus du système respiratoire contient des nanoparticules. Les particules peuvent être éliminées de

l'appareil respiratoire grâce au fonctionnement de l'appareil mucociliaire respiratoire qui permet de ramener les particules captées au niveau du carrefour aéro-digestif où celles-ci seront ensuite dégluties puis transportées par la voie digestive (Afsset 2006)(Figure 17).

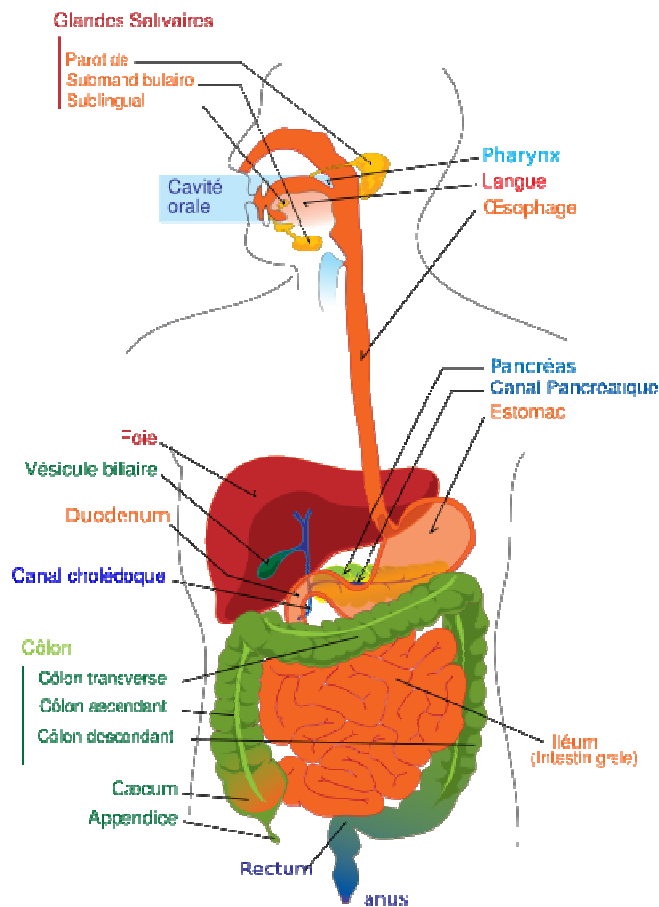


Figure 17: Système digestif de l'homme (<http://fr.wikipedia.org>)

Cependant les principales sources d'ingestion pour la voie digestive sont les aliments, les médicaments (où les nanoparticules sont de plus en plus utilisées) ou l'eau. La voie digestive peut aussi intervenir lors d'un contact main – bouche (exemple typique de la cigarette) quand la première a des nanoparticules déposées sur sa peau (Aitken et al. 2004). Dans ce cas, les particules ultrafines peuvent passer dans le sang lorsqu'elles atteignent les intestins (G. Oberdorster et al. 2005).

#### 1.1.2.1.3. Voie cutanée

##### Définition de la peau

La peau est constituée de trois tissus conjonctifs : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Barus 2008)(Figure 18).

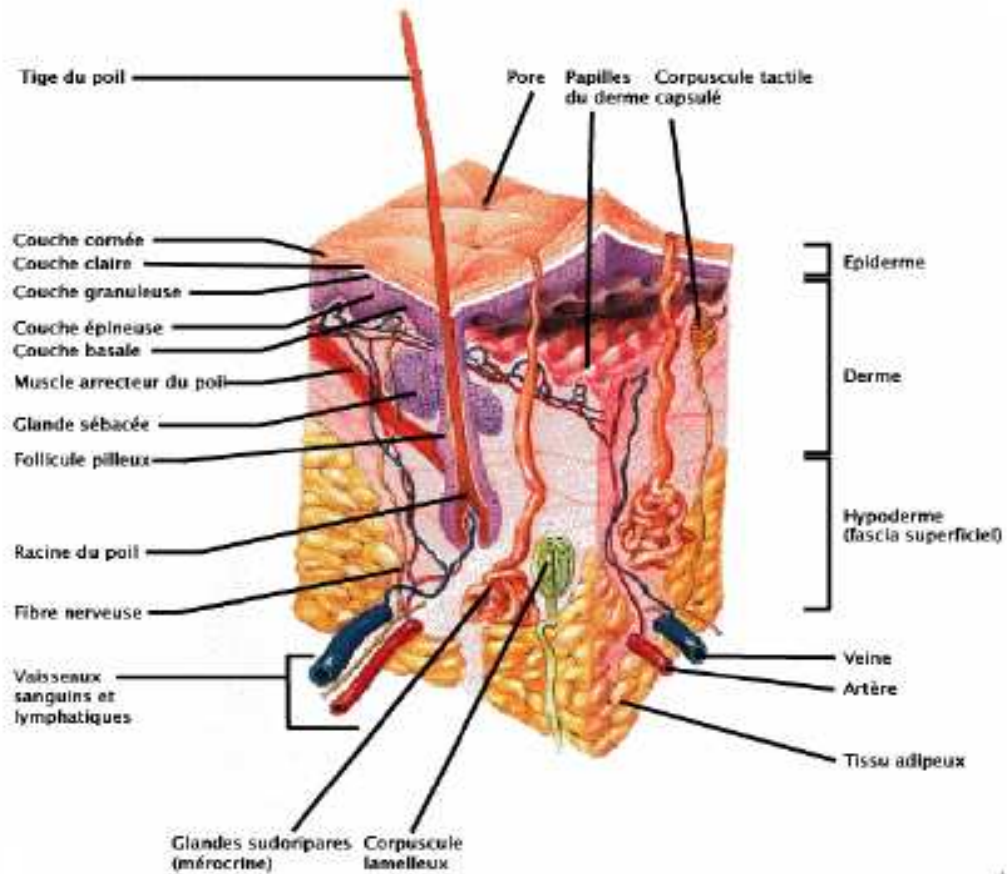


Figure 18: Coupe schématique de la peau(Corre 2005)

### L'épiderme

L'épiderme est la couche superficielle de la peau qui recouvre le derme. Son épaisseur peut varier entre 0,05 mm à 1,5 mm. Le rôle de l'épiderme est d'assurer l'imperméabilité et la résistance de la peau. Il est composé de cellules qui sont alimentées par diffusion dans le derme, de terminaisons nerveuses qui sont responsables des douleurs en cas de lésions superficielles de la peau, il est recouvert d'un film hydrolipidique, le sébum, produit par les glandes sébacées du derme, qui le protège des agressions extérieures, il n'est par contre irrigué par aucun vaisseau sanguin.

### Le derme

Le derme est un tissu de type conjonctif dont l'épaisseur peut varier selon les régions corporelles entre 5 à 9 millimètres (Méliissopoulos 1998). Il est composé pour l'essentiel de fibres de collagène, de fibres d'élastine et de fibronectine qui donnent à la peau souplesse, élasticité et résistance. Cette matrice extracellulaire baigne dans une sorte de gel formé de glycosaminoglycanes. Cette protéine agit comme une éponge en captant l'eau dans le derme et

en servant de réservoir d'hydratation. Le derme comporte également de nombreuses fibres nerveuses, des vaisseaux lymphatiques et sanguins qui permettent la nutrition de l'épiderme par diffusion, des follicules pileux, des glandes sébacées sécrétant le sébum, des glandes sudoripares ainsi que des cellules du système immunitaire (lymphocytes, mastocytes, macrophages et autres globules blancs) (Wysocki 1999).

L'hypoderme

L'hypoderme est une zone sous-cutanée d'épaisseur variable qui est composé de tissus adipeux (cellules graisseuses) et conjonctifs (fibroblastes). Son rôle est de servir d'interface entre le derme et les structures mobiles situées en dessous de lui (muscles, tendons...). Il protège également l'organisme des chocs et sert de réserve énergétique (lipides, acides gras) et d'isolant thermique (Mélissopoulos 1998).

#### **Pénétration des nanoparticules par voie cutanée**

L'exposition aux nanoparticules par voie cutanée est probablement faible en raison du temps long de dépôt sur les surfaces. Néanmoins cette voie de pénétration ne peut pas être négligée pour plusieurs raisons, tout d'abord lors de manipulations directes au poste de travail mais aussi lors de l'utilisation de produits cosmétiques (crèmes solaires, déodorants, dentifrices, rouge à lèvres...) ou de textile (autonettoyants, anti-bactériens, anti-tâches, hyper-isolants...). L'utilisation des nanoparticules dans de tels produits a comme intérêt (du fait qu'elles soient invisibles à l'œil nu) de ne pas laisser de trainées blanches sur la peau tout en conservant les propriétés protectrices (Alexander 1991). Les principales nanoparticules susceptibles de pénétrer par voie cutanée sont l'argent utilisé pour le textile, le dioxyde de titane pour les crèmes solaires et l'aluminium dans les déodorants.

Différents facteurs sont susceptibles d'influencer la pénétration cutanée :

- La taille : les nanoparticules de taille inférieure à 100 nm sont de petite taille à l'échelle cellulaire. En effet si l'on regarde l'échelle du monde vivant (Figure 4) nous constatons que celles-ci sont plus petites que les globules rouges, les bactéries et sont de l'ordre de grandeur des virus. On peut donc penser qu'elles pourraient avoir des facilités à passer la barrière cutanée pour atteindre le derme qui est riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, en nerfs sensitifs et en cellules dendritiques.
- Les propriétés de surface des particules : les particules utilisées dans les formulations cosmétiques sont généralement traitées en surface pour limiter à la fois la formation de radicaux libres, l'agrégation et améliorer la stabilité dans le temps des formulations. Un revêtement hydrophobe des nanoparticules pourrait favoriser la pénétration cutanée grâce à une affinité plus marquée pour les lipides du *stratum corneum*.

- Les « défauts de la cuirasse », c'est-à-dire l'existence de pores, qui constituent une voie de pénétration, ou encore la présence de sueur, laquelle peut modifier la surface des particules (dissolution partielle, formation d'espèces chimiques nouvelles...)(Hervé-Bazin & Collectif 2007).

La plupart des études sur la pénétration par voie cutanée ne montrent pas ou faiblement une pénétration de nanoparticules dans l'épiderme, sans qu'il y ait de passage dans le derme lorsque celui-ci est intact (Alvarez-Roman et al. 2004; M. Simon 2009). L'épiderme semble donc être une barrière efficace pour empêcher la pénétration des nanoparticules mais à condition que celui-ci ne soit pas lésé. Cependant le follicule pileux a été montré comme une voie de pénétration pertinente pour les particules ainsi qu'un important réservoir à long terme. Il a été démontré que la profondeur de pénétration des particules peut être influencée par leur taille résultant en la possibilité de cibler des structures folliculaires spécifiques (Lademann et al. 2011). Des études montrent donc une pénétration des nanoparticules dans le derme attribuée à des lésions cutanées ou à une ouverture des follicules pileux et non à une diffusion dans l'épiderme (Tinkle et al. 2003; Mavon et al. 2007; M. Simon 2009). Le passage ou non des nanoparticules par la peau dépend de différentes caractéristiques.

La voie cutanée a fait l'objet d'un projet européen « NANODERM » dans lequel ont été utilisées de nouvelles technologies (microscopie ionique à haute résolution, radiotraceurs) sur des coupes de peau afin d'étudier la capacité de la peau comme barrière mécanique contre les formulations contenant des nanoparticules afin de connaître l'effet de ces nanoparticules.

#### 1.1.2.2. Effets des particules inhalées sur la santé

Plusieurs maladies pulmonaires liées aux fines poussières en milieu de travail sont connues depuis longtemps : pneumoconiose, cancer pulmonaire, fièvre du soudeur, asthme du boulanger...(Salmeron 2008).

Les poussières ultrafines, de mêmes dimensions que les nanoparticules, pénètrent principalement dans l'organisme via l'inhalation et se déposent dans les poumons, une partie pouvant se distribuer directement au cerveau pour les nerfs olfactifs. Les poumons ne réussissent pas nécessairement à éliminer ces particules indésirables qui causent alors une réaction inflammatoire pouvant conduire au développement de certaines maladies pulmonaires spécifiques selon la nature des particules en question (fibroses interstitielles, bérylloses, bronchite obstructive...). De plus, ces très fines poussières peuvent franchir les différentes barrières de protection pulmonaire, atteindre le système sanguin et lymphatique et ensuite être distribuées dans toutes les parties du corps où elles pourront causer des

dommages de différentes natures. Oberdörster (2005) résume les effets sur l'organisme de l'inhalation de poussières ultrafines de dimensions nanométriques dans la Figure 19. Les particules qui ont subi une translocation peuvent alors induire divers dommages dans différentes parties de l'organisme.

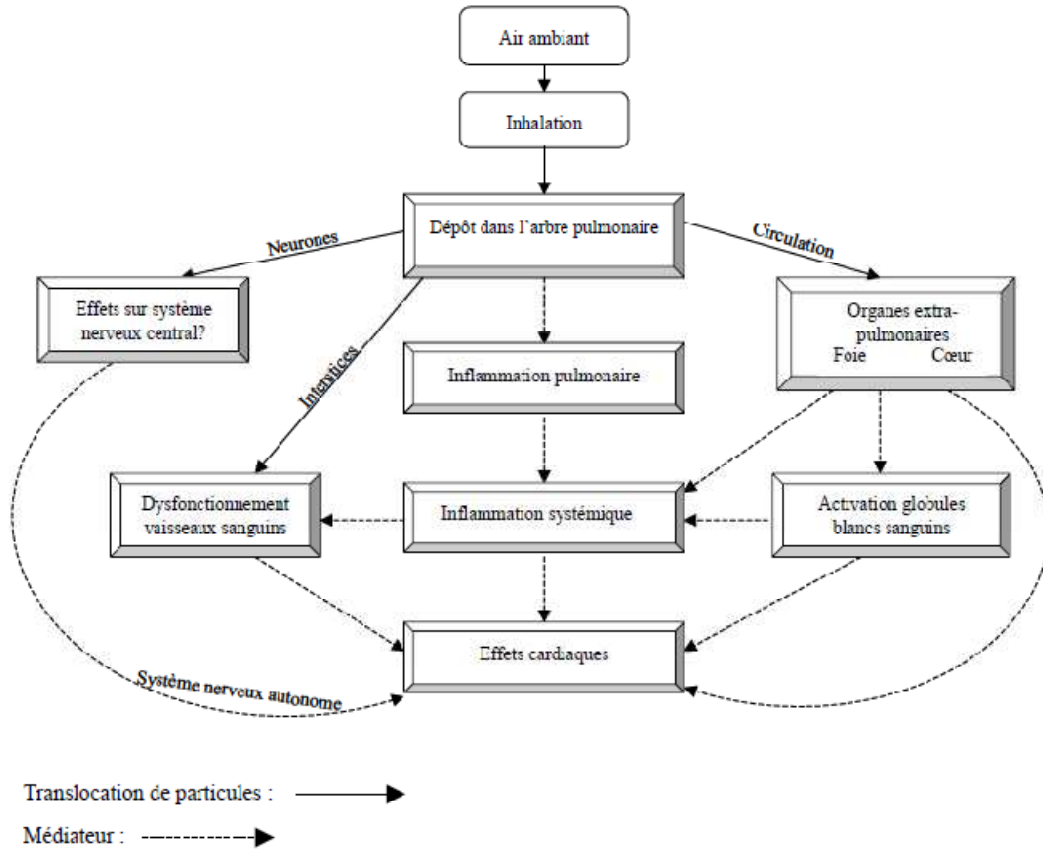
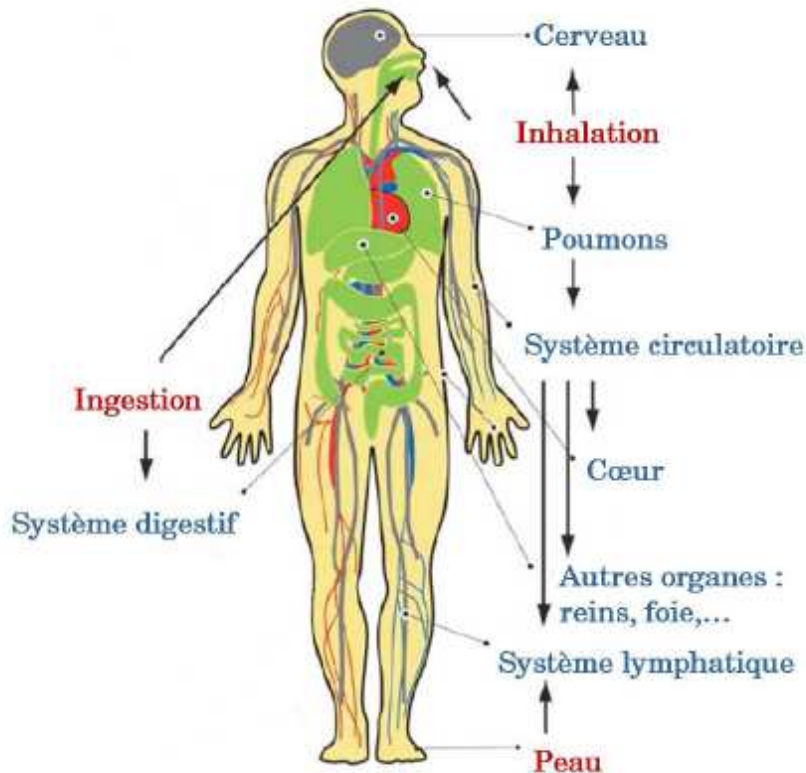


Figure 19: Effets potentiels des particules ultrafines inhalées (G. Oberdorster et al. 2007)

### 1.1.2.3. Translocations, biodistribution et biopersistence

Comme il a été vu précédemment, de par leur petite taille, les nanoparticules sont capables de passer les barrières biologiques et physiques et ainsi diffuser ou se distribuer dans tout l'organisme (Figure 20).



*Figure 20: Schéma du corps humain avec les voies d'exposition aux nanoparticules et les organes touchés (Buzea et al. 2007)*

#### 1.1.2.3.1. Translocation

La translocation (passage des barrières physiologiques) après inhalation est à priori assez spécifique aux nanoparticules. A travers ce phénomène de translocation les particules insolubles ou peu solubles déposées dans l'arbre pulmonaire sont éliminées du système respiratoire et transférées ailleurs dans l'organisme. Les particules les plus grosses qui se déposent normalement dans les parties supérieures des poumons, principalement au niveau de la trachée et des bronches, sont éliminées par le mécanisme de clairance mucociliaire où les muqueuses de la trachée et des bronches sont recouvertes de cellules ciliées qui forment un « ascenseur » et repoussent le mucus contenant les particules vers le système digestif. C'est normalement un mécanisme efficace qui élimine les particules en moins de 24 heures, même les particules ultrafines ou alors qui entraîne une translocation au niveau digestif.

Dans la région alvéolaire ce sont les macrophages alvéolaires qui sont les acteurs principaux de l'élimination des particules. Il s'agit aussi de la première barrière empêchant les nanoparticules de transloquer à travers la barrière épithéliale. Cette élimination se fait par la



phagocytose des particules (Geiser et al. 2008), migration des macrophages jusqu'à l'ascenseur mucociliaire et passage dans le tractus digestif (environ 6-12h après phagocytose). L'étape de phagocytose est rapide mais la clairance peut être un phénomène très long, en effet la demi-vie d'une particule solide dans la région alvéolaire est de 70 jours chez le rat et de plus de 700 jours chez l'homme (Oberdörster et al. 2005b).

Après pénétration par voie cutanée, les nanoparticules peuvent rester localisées dans le derme ou être transloquées par le sang ou encore les nerfs sensitifs. Il existe d'autres modes de transport des nanoparticules qui 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 alvéolo-capillaire vers la circulation systémique. Plusieurs travaux ont évalué l'existence d'un passage systémique de différentes nanoparticules dans l'appareil respiratoire, après instillation intratrachéale ou après inhalation (Nemmar et al. 2001; G. Oberdorster et al. 2002c; S Takenaka et al. 2006d).

#### *1.1.2.3.2. Biodistribution*

La biodistribution est la répartition des nanoparticules dans le corps après pénétration par une des voies d'entrée précédemment définies, ainsi que leur translocation éventuelle à d'autres territoires de l'organisme après franchissement de barrière telle que : barrière alvéolo-capillaire pour l'appareil respiratoire, mais aussi hémato-encéphalique ou hémato-testiculaire.

Les organes extrapulmonaires peuvent être franchis par les particules ultrafines via la circulation sanguine et lymphatique ou alors certaines particules peuvent être transportées le long des axones des nerfs sensitifs vers le système nerveux central jusqu'à atteindre des tissus et organes éloignés du site d'entrée (foie, rate, reins, cœur, cerveau...). Ainsi l'équipe de Kreyling et al. (W G Kreyling et al. 2002b) a montré que l'inhalation durant 1h d'un aérosol de nanoparticules d'iridium radioactif (15 et 80nm) chez le rat entraîne le passage d'1% de la fraction totale inhalée. L'iridium est retrouvé dans le foie, la rate, le cœur et le cerveau donc franchissement de la barrière alvéolo-capillaire et hémato-encéphalique.

D'autres études ont montré chez le rat que les nanoparticules peuvent atteindre les tissus interstitiels et les capillaires sanguins de l'épithélium alvéolaire (S Takenaka et al. 2006d; W. Moller et al. 2008; Yang et al. 2008). En effet Oberdorster et al. ont montré une accumulation de nanoparticules de carbone de 35 nm de diamètre dans le bulbe olfactif qui est dépendante du temps (G. Oberdorster et al. 2004). Une estimation pour l'homme a été réalisée en utilisant un modèle de cartographie de dépôt des particules et des données sur les paramètres olfactifs,

qui permet de penser que la translocation de nanoparticules de 20 nm serait de 1,6 à 10 fois plus importante chez l'Homme que chez le rat (Oberdörster et al. 2005).

L'équipe de Sadauskas a montré qu'après administration par voie intratrachéale de nanoparticules d'or de 2, 40 et 100nm à des souris, les nanoparticules ont été retrouvées dans les macrophages alvéolaires témoignant de leur activation et de la mise en jeu probable d'un processus de phagocytose seulement 1h après l'instillation. Un faible pourcentage a été retrouvé dans le foie, seule une infime quantité à donc été transportée par voie systémique (<3%)(Sadauskas et al. 2009).

De plus l'intensité d'accumulation et de bio-persistance de ces nanoparticules dans ces différents organes dépendent beaucoup des caractéristiques physico-chimiques de ces dernières, en particulier de leur nature, de leur taille et de leur fonctionnalisation de surface.

Hirn et al. ont en effet montré l'importance de la taille et de la charge des nanoparticules dans la biodistribution. Ils ont administré des nanoparticules d'or de taille variable (1,4, 5, 18, 80 et 200nm) et de charge différentes par injection intraveineuse à des rats. Il a été montré que l'accumulation dans le foie des nanoparticules était de 50% pour les tailles de 1,4nm et de 99% pour les nanoparticules de 200nm. En revanche il y a peu d'accumulation dépendant de la taille dans les autres organes. La différence de charge conduit à une accumulation significativement différente dans plusieurs organes. Ils concluent donc que la biodistribution est variable selon la taille et la charge de surface des nanoparticules d'or (Hirn et al. 2011).

### 1.1.2.3.3. Biopersistance

Les macrophages sont des cellules spécialisées dans l'internalisation de composés extracellulaires par phagocytose. Cependant d'autres mécanismes d'internalisation existent comme la pinocytose (molécules solubles) ou l'endocytose médiée par des récepteurs (Figure 21).

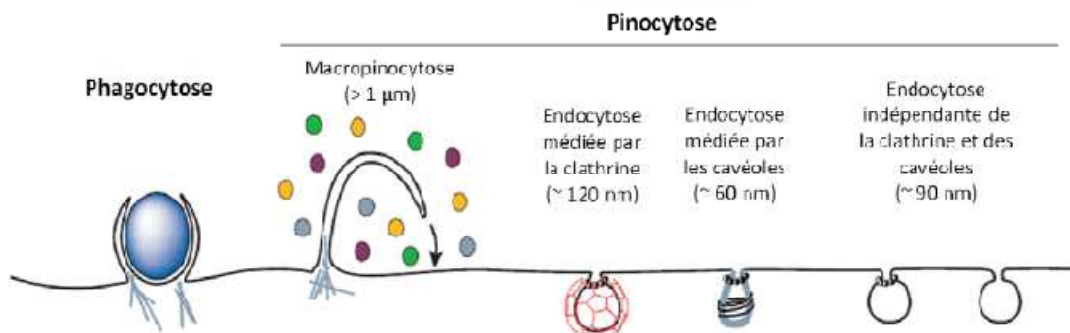


Figure 21: Différents mécanismes d'internalisation (Conner & S. Schmid 2003a)

## Phagocytose

La phagocytose étant un mécanisme d'internalisation puis d'élimination des particules, les étapes qui mènent à cette internalisation nécessitent des réarrangements massifs de divers compartiments cellulaires afin d'aboutir à la formation d'un compartiment supplémentaire de grande taille dans lequel la particule sera enfermée, dégradée puis éventuellement recyclée. Ces mécanismes se déroulent en plusieurs étapes successives et mettent en jeu des cellules phagocytaires dont les plus connues sont les monocytes (sang), les macrophages (tissu) mais aussi les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques (Figure 22). La première consiste en la reconnaissance de la particule par des récepteurs membranaires. De nombreux types de ligands et de récepteurs ont été impliqués dans la phagocytose. Parmi les ligands, nous comptons par exemple des motifs consensus à la surface des bactéries, des protéines et des débris cellulaires, des composés spécifiques des cellules apoptotiques, de l'exposition des résidus phosphatidylserines à la surface membranaire ou encore l'interaction avec des particules inertes comme les billes de latex. Les récepteurs quant à eux correspondent plus ou moins spécifiquement aux différents ligands et peuvent agir seuls ou en interaction (Stuart & Ezekowitz 2005). Cette étape déclenche la signalisation intracellulaire qui conduit à la formation de pseudopodes, excroissance de la membrane plasmique entourant progressivement la particule à ingérer.

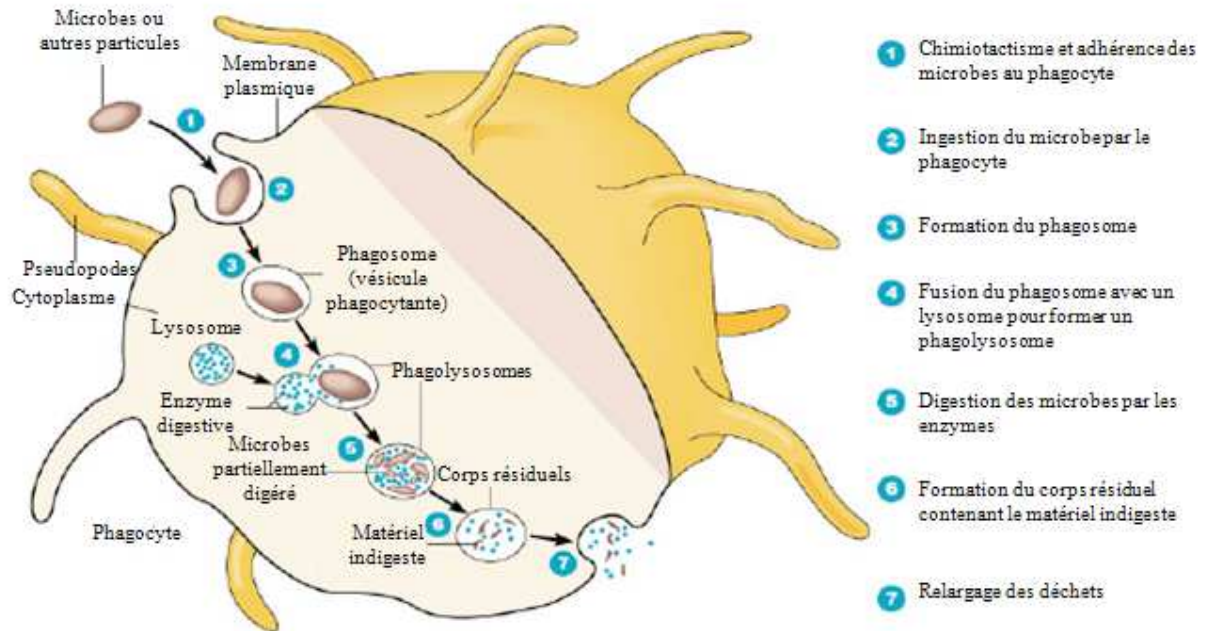
Cette extension se fait sous l'impulsion du cortex sous membranaire d'actine qui crée la force motrice poussant sur la membrane plasmique (Castellano et al. 2001). Cette extension s'accompagne aussi d'insertions de membranes issues de différents compartiments intracellulaires afin de maintenir la surface globale de la cellule.

Cette insertion de membrane, ou exocytose focale, permet également de modifier la composition lipidique et protéique du phagosome jouant ainsi un rôle supplémentaire dans la signalisation au cours de la phagocytose (Niedergang & Chavrier 2004).

Lorsque les pseudopodes ont totalement entouré la particule, ils fusionnent grâce à un mélange d'activités contractiles et de réarrangements de la membrane (Araki 2006). Le phagosome ainsi internalisé s'éloigne ensuite de la membrane plasmique pour rejoindre la région péri-nucléaire. Au cours de cette migration au sein de la cellule, le phagosome subit de nombreux réarrangements par interaction avec la voie endosomale, conduisant à la formation d'un phagolysosome caractérisé par une acidification et la présence d'enzymes de dégradation.

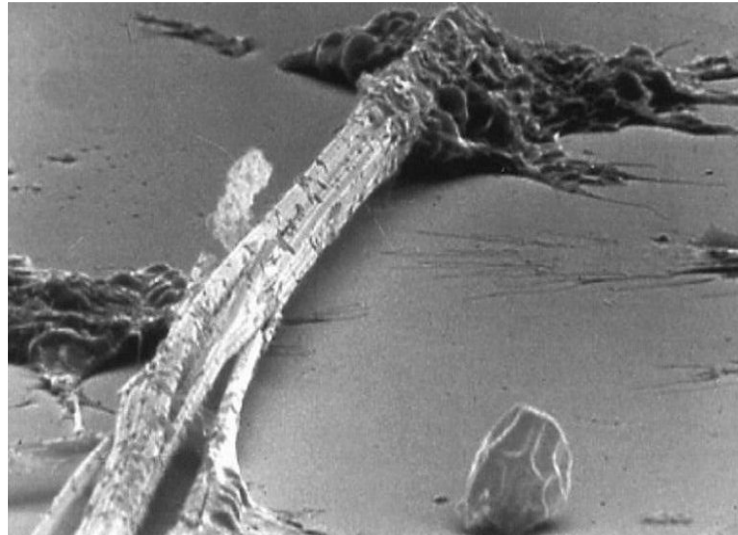
Enfin, après dégradation de la particule, celle-ci sera recyclée de diverses façons en fonction du type cellulaire et de la particule ingérée, avec comme fonctions principales la nutrition de la cellule, l'élimination de pathogène et le recyclage de peptides pour la présentation de l'antigène nécessaire à l'immunité spécifique. Mais dans certains cas les

particules ne peuvent être digérables, et nous parlons de macrophages à poussières qui accumulent les particules au niveau cytoplasmique ex : particules de fumée de cigarettes.



**Figure 22: Mécanisme de phagocytose avec les principales étapes (Extrait de Pearson Education, mad-physio.blogspot.com)**

L'efficacité de ce mécanisme dépend beaucoup de la capacité des macrophages à détecter les particules puis à se déplacer jusqu'à elles et enfin de les phagocyter. Ainsi les fibres > 20 µm ne peuvent être phagocytées du fait de leur grande taille, ce qui entraîne une longue demi-vie dans la région alvéolaire ou biopersistance (Figure 23). Cette inefficacité dans l'élimination de ce type de particules notamment fibreuses dans la région alvéolaire par les macrophages entrainerait une plus grande interaction entre les nanoparticules et les cellules épithéliales des poumons (pneumocytes I et II), et pourrait ainsi donc favoriser la translocation de ceux-ci à travers la barrière épithéliale (Figure 14).



**Figure 23:** Cliché MEB d'un macrophage au contact d'une fibre d'amiante

### **Pinocytose**

La pinocytose est une forme d'endocytose qui permet la capture de fluides ou de macromolécules d'un diamètre inférieur ou égal à 150 nm et leur adressage vers les lysosomes en vue de leur digestion. La pinocytose résulte de l'invagination continue de la membrane plasmique. L'endocytose par pinocytose est non spécifique et permet donc potentiellement la capture de n'importe quel antigène soluble de petite taille.

### **Endocytose médiée par un récepteur**

L'endocytose médiée par un récepteur peut impliquer la clathrine ou la cavéoline ou être indépendante de ces deux molécules. Une fois formée, la vésicule d'endocytose suit un processus dit de maturation, caractérisé par la fusion avec les endosomes précoces puis, dans certains cas, les endosomes tardifs et finalement les lysosomes. Alors que le matériel contenu dans les endosomes précoces peut être recyclé à la membrane plasmique, celui des endosomes tardifs est généralement digéré par des enzymes lytiques dont l'activité est augmentée par l'acidité du pH de ces endosomes.

Les mécanismes impliqués dans l'adressage des antigènes capturés vers les endosomes précoces ou tardifs sont encore mal définis. Cependant, il semble dépendre, au moins en partie, du récepteur engagé lors de l'endocytose.

### **Macropinocytose**

La macropinocytose est un mécanisme d'endocytose dépendant de l'actine, permettant une internalisation massive et aspécifique de particules ou de solutés contenus dans des gouttelettes d'un diamètre de l'ordre du micromètre. La macropinocytose participe également à l'internalisation de certains pathogènes. Elle se distingue de la phagocytose par la présence de milieu extracellulaire au sein du macropinosome.

### **I.1.3. Nanotoxicologie**

#### *1.1.3.1. Influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité biologique*

Dans l'étude des effets biologiques des nanoparticules, il est indispensable de prendre en compte leurs caractéristiques physico-chimiques qui ont un impact certain sur la toxicité biologique (Günter Oberdörster 2002; Buzea et al. 2007; Warheit et al. 2008). Ces paramètres physico-chimiques sont résumés dans la figure 24:

---

*Propriétés et caractérisations physico-chimiques des nanomatériaux*

- Agglomération / aggrégation
- Solubilité dans l'eau
- Phase cristalline
- Relargage de particules («Dustiness»)
- Taille des cristallites
- Observation par Microscopie électronique en transmission
- Distribution de tailles de particules
- Surface spécifique
- Potentiel Zeta (charge de surface)
- Chimie de la Surface (si besoin)
- Activité Photocatalytique
- Rugosité
- Porosité
- Coefficient de partage octanol-eau
- Potentiel RedOx
- Potentiel de formation de radicaux
- Autres informations pertinentes

*Figure 24: Principaux paramètres physico chimiques(Gaffet 2011)*

##### *1.1.3.1.1. Granulométrie des particules*

Comme il a été vu dans la partie précédente, selon le modèle développé en 1994 (CIPR), le dépôt des nanoparticules inhalées dans chacune des trois régions du tractus respiratoire (le nasopharynx, l'arbre trachéobronchique et la région alvéolaire), dépend largement de leur diamètre aérodynamique, ce qui pourrait avoir des conséquences sur leurs effets potentiels. Ceci s'applique aux particules inhalées sous forme de particules bien individualisées ayant une taille déterminée et non sous forme d'agrégats.

En effet, les nanoparticules possèdent des propriétés d'agglomération et/ou d'agrégation plus ou moins importante. Les nanoparticules soumises aux forces de Van der Waals, électrostatiques ou aux tensions de surface, tendent à s'agglomérer entre elles (Prilutski et al.

1999). Elles peuvent aussi s'agréger entre elles si elles sont soumises à des forces plus importantes. Ces agglomérats ou agrégats, pouvant atteindre des tailles micrométriques, peuvent avoir des formes complexes et difficiles à caractériser. Les phénomènes d'agglomération et d'agrégation des nanoparticules peuvent laisser supposer un dépôt différent dans l'appareil respiratoire du fait de la modification de leur diamètre aérodynamique. D'après les travaux de Wang et al. sur le tractus digestif, l'agrégation peut influencer la tolérance aux particules. Ceux-ci ont montré que l'administration par voie orale de nanoparticules de zinc entraîne le décès de souris lorsque les particules sont des nanoparticules qui s'agrègent entraînant des occlusions intestinales (B. Wang et al. 2006). Les nanoparticules ont tendance à s'agglomérer en milieu biologique (sang, sérum, plasma, milieu de culture...) lors des tests *in vitro*. Les milieux étant constitués de nombreux composants, les nanoparticules ont la capacité de former des agrégats par adsorption de protéines. Ceci pourra avoir une influence importante dans la clairance des particules et dans leurs effets immunologiques et toxicologiques. Drescher et al. ont mis des particules de LUDOX 50 composé de silice dans du milieu de culture en présence de sérum de veau et ont observé l'agglomération des particules par diffraction dynamique de la lumière couplée à de la microscopie électronique à transmission. Dans le milieu de culture sans sérum aucune agglomération n'est observée. Le sérum de veau est donc responsable de l'agglomération des particules. Ils complètent leurs résultats en montrant une variation de la cytotoxicité de nanoparticules de LUDOX 50 en fonction de leur agglomération sur un modèle cellulaire de fibroblaste (Drescher et al. 2011). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux (Orts-Gil et al. 2011).

#### 1.1.3.1.2. Morphologie des particules

Comme il a été vu précédemment, les nanoparticules existent sous différentes formes (par exemple : sphériques, fibreuses, tubulaires, circulaires et planes). Or il a été montré que la forme des nanoparticules peut être responsable en partie de leurs effets biologiques.

En effet des études toxicologiques expérimentales *invitro* et *in vivo* sur les particules sphériques et fibreuses de taille micrométrique ont montré que les particules fibreuses naturelles, comme l'amiante, ou manufacturées, comme les fibres vitreuses, sont associées à des effets cytotoxiques et génotoxiques accrus et à un risque augmenté de survenue de fibroses pulmonaires et de cancers bronchopulmonaires (Stanton et al. 1977).

Watanabe et al. montrent pour des particules de TiO<sub>2</sub> et des fibres de TiO<sub>2</sub> des résultats différents en terme de toxicité. En effet, un relargage plus important de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture, indicateur de cytotoxicité, a été mesuré

après exposition aux particules fibreuses de  $\text{TiO}_2$ . De plus les résultats obtenus par observation par microscopie électronique ont montré des changements vacuolaires et des dommages des surfaces cellulaires de macrophages exposés à des particules fibreuses de  $\text{TiO}_2$ . En revanche, aucun changement significatif n'a été observé chez les macrophages exposés à des particules sphériques de  $\text{TiO}_2$ . Les résultats obtenus suggèrent que la cytotoxicité du matériau dépend clairement de la morphologie du matériau (Watanabe et al. 2002).

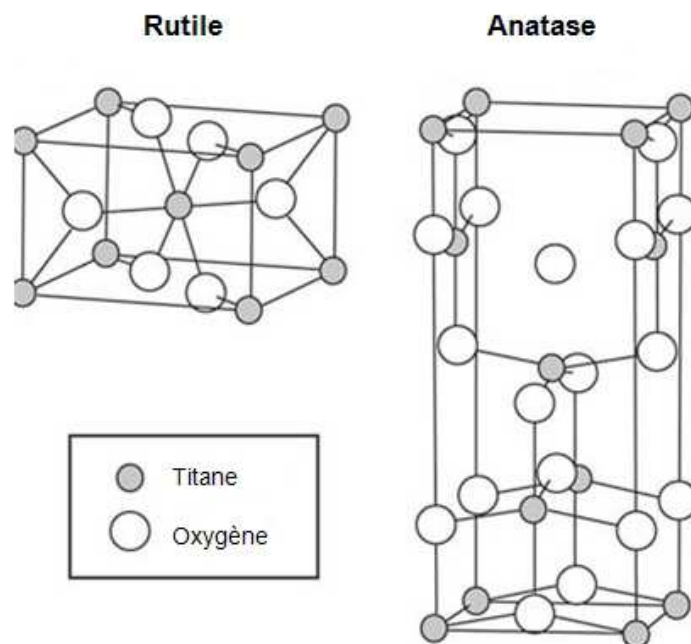
Une autre étude vient confirmer ces premiers résultats. Tarantola et al. montrent l'impact des nanoparticules d'or de formes différentes recouvertes de CTAB (Bromure de cetyltriméthylammonium) sur la physiologie cellulaire. Les particules d'or sont sous formes de sphères ou de cylindres. Ils ont constaté que les nanoparticules d'or sphériques avec fonctionnalisation de surface identiques sont généralement plus toxiques et plus efficacement ingérées que les particules en bâtonnets (Tarantola et al. 2011).

#### *1.1.3.1.3. Effet de la taille et de la composition chimique et cristalline de surface*

Les nanomatériaux possèdent des propriétés spécifiques dues à leur petite taille et à leur grande surface spécifique. La surface va donc jouer un grand rôle dans la prise en compte des caractérisations physico-chimiques des particules. Pour une même masse de particule avec la même composition chimique et la même structure cristalline, une toxicité plus importante a été trouvée par les particules ayant une surface spécifique plus importante. Une étude sur des souris après instillation intratrachéale de dioxyde de titane montre que les petites particules de 20 nm induisent une réponse inflammatoire plus importante que les particules plus grosses de 250 nm pour une même dose en masse. Si la dose a la même surface spécifique, elles génèrent des toxicités similaires (G. Oberdorster et al. 2005).

Vient aussi s'ajouter la composition chimique et la structure cristalline des nanoparticules aux paramètres physico-chimiques à prendre en compte lors de l'étude des nanoparticules. En effet la toxicité peut dépendre du type de forme cristalline. Par exemple, le rutile et l'anatase sont deux formes allotropiques du dioxyde de titane (Figure 25), polymorphes avec la même composition chimique mais de structure cristalline différente. Les nanoparticules de rutile (200nm) induisent des dommages de l'ADN en l'absence de lumière alors que les nanoparticules d'anatase n'entraînent rien (Gurr et al. 2005).





*Figure 25: Structure cristallographique du rutile et de l'anatase (Buzea et al. 2007)*

Les nanoparticules peuvent changer de structure cristalline après interaction avec des liquides. Par exemple, les nanoparticules de sulfure de zinc (ZnS) réarrangent leur structure cristallographique en présence d'eau (H. Zhang et al. 2003).

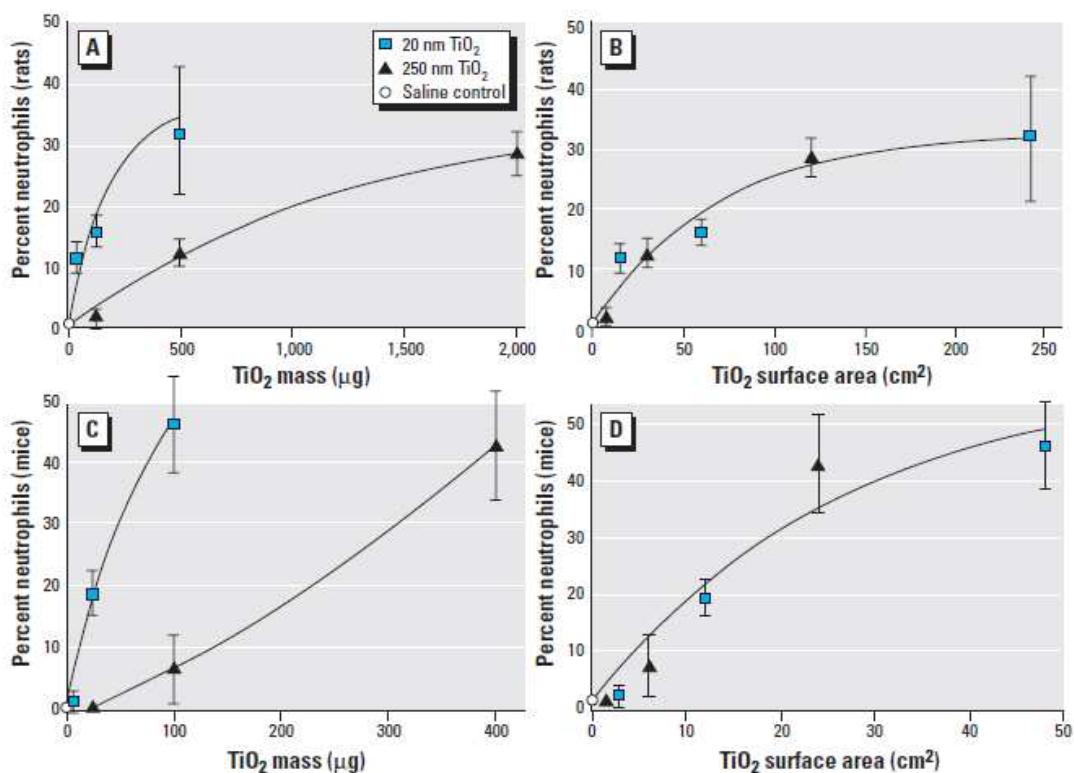
Un autre paramètre important intervient c'est le revêtement de surface. Les revêtements de surface peuvent rendre les particules nocives non toxiques tandis que les particules moins nocives peuvent devenir très toxiques. La présence d'oxygène, d'ozone (Risom et al. 2005), de radicaux oxygénés (C. Sayes et al. 2004), et de métaux de transition sur des surfaces de nanoparticules conduit à la création d'espèces réactives oxygénées et à l'induction de l'inflammation. Par exemple, l'inflammation spécifique de la silice est fortement associée à l'apparition de radicaux en surface et d'espèces réactives oxygénées. Des expériences réalisées sur les hamsters ont montré que la formation de caillots sanguins est plus importante lorsque la surface des nanoparticules de polystyrène est aminée (N. Li et al. 2003). Les particules émises par les gaz d'échappement ayant interagit avec la couche d'ozone causent une augmentation de l'inflammation dans les poumons de rats par rapport aux particules émises par les gaz d'échappement seulement. Les nanoparticules d'or sphériques avec des revêtements de surface différents ne sont pas toxiques pour les cellules humaines, en dépit du fait qu'elles soient intériorisées (Goodman et al. 2004; Connor et al. 2005). Les quantum dots de Cadmium-Sélénium (CdSe) peuvent être rendu non toxiques quand ils sont convenablement traités (Derfus et al. 2004).

#### 1.1.3.1.4. Dose et métrique en nanotoxicologie

L'expression de la dose des nanoparticules conditionne les effets biologiques. En effet dans de nombreuses publications nous pouvons voir des résultats exprimés en dose massique (B Fubini 1998; G. Oberdorster 2000; G. Oberdorster et al. 2005). De cette façon des relations entre la dose massique et la réponse des macrophages (inflammation, stress oxydant) ont été observées pour des poudres de silice (Bruch 2004) ou des poudres de SiC (Bouhmadi 2009) par exemple. Ces études ont montré des corrélations significatives entre la masse des particules et certains paramètres étudiés (état d'inflammation, stress oxydant...)

Comme montré précédemment la taille est un paramètre important car des particules de même nature chimique mais n'ayant pas la même taille n'auront pas le même comportement biologique car les propriétés des nanoparticules diffèrent des propriétés des macroparticules.

Une étude d'Oberdorster a montré qu'il était utile de tracer les résultats en surface (Figure 26). Dans la pratique, les résultats sont calculés en masse puis convertis en surface.



**Figure 26: Pourcentage de PMN recrutés dans les alvéoles pulmonaires après 24h d'inflammation déclenchée par instillation intratrachéale de particules de TiO<sub>2</sub>. (Oberdorster et al. 2000)**

Les résultats pour les graphiques A et C (tracé en fonction de la masse) montrent une réponse beaucoup plus importante pour les particules de 20 nm que pour les particules de 250 nm. Or lorsque l'on regarde les résultats en masse convertis en surface (graphiques B et D) on

constate que les deux réponses se superposent. On a donc une réponse similaire pour les particules de 20 et de 250 nm (G. Oberdorster et al. 1994).

Au cours de notre étude nous avons donc choisi de prendre en compte ces considérations afin d'exprimer comparativement nos résultats en fonction de la masse mais aussi de la surface.

#### 1.1.3.2. Réglementation

Il n'existe aucun consensus spécifiquement lié à la synthèse et manipulation des nanoparticules. Les industriels travaillant actuellement sur ce type de composés ont généralement deux attitudes opposées : soit ils utilisent les données de sécurité des matériaux dont sont faites les nanoparticules sans plus de considération pour leurs caractéristiques particulières liées à leur taille nanométriques; soit ils considèrent les nanoparticules comme des substances potentiellement dangereuses et les manipulent avec les équipements classiques de sécurité (qui ne sont cependant pas toujours adaptés). En effet sur l'ensemble des substances présentes sur le marché, peu d'entre elles ont réellement été testées *in vitro* et *in vivo* dans des conditions adaptées. En effet, d'après Neal, sur les 80 000 nanoparticules enregistrées sur le marché américain, seuls 530 ont subis des tests sur la toxicité à court terme, et seulement 70 sur la toxicité à long terme (Neal 2008).

Trois options concernant la réglementation sont envisageables :

- établir un cadre réglementaire spécifique de type (REACH) par exemple
- adapter des réglementations existantes (réglementations sur les produits manufacturés par exemple)
- « Safer by design »

#### **REACH**

Les nanoparticules pourraient relever de la réglementation REACH en tant que substances chimiques. Néanmoins, REACH inclue des seuils de tonnages annuels de production (1000T/an) que n'atteignent généralement pas les laboratoires et industries produisant des nanoparticules. Par conséquent les nanoparticules échappent majoritairement pour l'instant à cette réglementation. L'intégration des nanoparticules dans la réglementation REACH pourrait se faire par l'extension des dispositions concernant plusieurs familles de substances dites « très préoccupantes » (CMR : Cancérigène, mutagène et toxique pour la reproduction, PBT :Persistant, Bioaccumulable et Toxique, vPvB :très Persistant et très bioaccumulable, perturbateurs endocriniens) (Compte-rendu débat INERIS – Associations 2008).

### Réglementation des produits manufacturés avant mise sur le marché

Lorsque les substances sont intégrées à un produit manufacturé, elles sont susceptibles de relever de diverses réglementations relatives à la mise sur le marché des produits les contenant (ex : directives sur les biocides, les pesticides, les médicaments à usage humain et vétérinaire, les produits cosmétiques). C'est alors via le produit tel qu'il est utilisé par un professionnel ou par un consommateur que la nanoparticule manufacturée pourra être évaluée. Mais la réglementation applicable aux produits manufacturés n'est pas non plus très adaptée aux particularités des nanoparticules. Comme le précise le Comité de la Prévention et de la Précaution, lorsque les nanoparticules sont intégrées à un produit manufacturé, les risques qui leur sont attachés ne font pas davantage l'objet d'une évaluation spécifique. Par exemple s'agissant des produits cosmétiques, la directive 76/768/CEE pose comme principe général que seuls les produits cosmétiques qui ne sont pas susceptibles de nuire à la santé humaine peuvent être mis sur le marché. Mais cette appréciation se fait indépendamment du procédé de fabrication utilisé et de la taille d'une substance donnée contenue dans les produits cosmétiques (Compte-rendu débat INERIS – Associations 2008).

### Nanosafe

Un projet européen de recherches a été développé sur la production sécurisée des nanomatériaux : Nanosafe. Le CEA a travaillé depuis plusieurs années sur la sécurisation des procédés de production des nanomatériaux. Il a conduit une partie de ses recherches dans un cadre européen et a coordonné le programme européen Nanosafe.

Après Nanosafe 1, programme qui a permis d'établir un état des lieux des risques associés, Nanosafe 2, lancé en 2005 à l'initiative du CEA, implique 24 organismes de recherche et industriels. Ce projet est financé par la Commission Européenne dans le cadre du 6<sup>ème</sup> PCRD (Programme Cadre de Recherche et Développement).

Nanosafe 2 ne prétend pas traiter toutes les nanoparticules mais s'attache à un certain nombre de particules et de situations de références afin d'apporter les premières solutions industrielles. Nanosafe 2 s'intéresse à l'ensemble du cycle de vie des nanoparticules: production, conditionnement, stockage, transport, transformation en produit fini et destruction.

Les principaux objectifs de Nanosafe 2 sont :

- le développement de méthodes innovantes de détection et de traçabilité dans l'air et dans l'eau et la mise au point de méthodes d'étude de la toxicité et de la propagation des particules dans les milieux et les organes, élaboration d'un modèle toxicocinétique ;

- l'acquisition d'une bonne connaissance et compréhension des phénomènes toxiques associés à la production et l'utilisation des nanoparticules, la création d'une base de données des connaissances disponibles ;
- le développement de technologies permettant de limiter l'exposition aux nanoparticules et les rejets dans l'environnement ;
- l'évaluation des impacts sociétaux et environnementaux ;
- la contribution à de nouvelles réglementations et normalisations pour les nanoparticules ;
- la législation et la réglementation applicables aux nanotechnologies, dialogue avec la société civile et recommandations aux pouvoirs publics (Commissariat à l'Energie Atomique 2008).

### Safer by design

Au vu du grand nombre de nanomatériaux, il est difficile d'apporter une réponse sur la toxicité de chacun d'eux en les étudiant au cas par cas. De plus d'un point de vue coût et durée des travaux nécessaires pour réaliser les études de nanotoxicologie sur les nanomatériaux déjà existants (Choi 2004), cela coûterait à l'industrie américaine entre 249 millions et 1,18 milliard \$ pour une durée de plus de 50 ans.

Cette approche a donc pour intérêt de comprendre les caractéristiques des nanomatériaux afin de produire des nanomatériaux « safe by design ». C'est une approche différente puisque l'objectif est de concevoir dès la conception et l'élaboration, des nanoproduits présentant le moins de risques possibles pour l'environnement et l'homme. Pour ce faire la maîtrise des risques des nanomatériaux doit être intégrée lors de la conception de ceux ci au même titre que l'élaboration ou la mise en œuvre.

Un panel d'experts internationaux du World Technology Evaluation Centre (WTEC) propose donc en 2010 de passer de données à courts termes à la mise en œuvre de bonnes pratiques en Hygiène et Sécurité industrielle (H&S), (WTEC 2010).

Cette approche aussi appelée éco conception des nanomatériaux a pour but de définir des critères et de prendre en compte l'évolution des matériaux tout au long de leur cycle de vie. Dans ce but un moyen mnémotechnique pour mémoriser: SAFER : S pour « size, surface and structure », A pour « Alternative materials », F pour « functionalization », E pour « Encapsulation » et R pour « Reduce the quantity » (Figure 27).

S	Size, surface, and structure	#1
A	Alternative materials	#2
F	Functionalization	#3
E	Encapsulation	#4
R	Reduce the quantity	#5

Figure 27: Les cinq principes de l'éco-conception des nanomatériaux (Morose 2010)

### 1.1.3.3. Rappel sur les altérations possibles du patrimoine génétique

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est la molécule-clé de la toxicologie génétique, elle est en effet présente dans toutes les cellules vivantes. C'est le support moléculaire de l'information génétique. Il se situe dans le noyau des cellules eucaryotes, dans la matrice des mitochondries ainsi que dans le cytoplasme des cellules procaryotes. L'ADN constitue le génome, mais également le support de l'hérédité car il se transmet en totalité lors de la division des cellules somatiques, ou partiellement lors de la réduction méiotique conduisant à la formation des gamètes. Trois niveaux de structures sont attribués à l'ADN : structure primaire (séquence de nucléotides ou de bases désoxyribonucléiques), structure secondaire (configuration des nucléotides au sein de la double hélice) et la structure tertiaire (état de l'ADN au cours de la réplication, la transcription, sous forme de chromosome ou chromatine)(Figure 28).

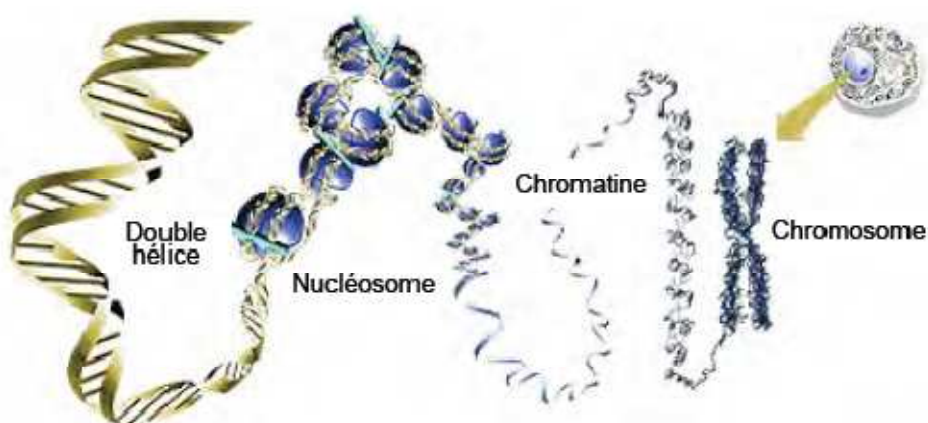


Figure 28: De l'ADN au chromosome (<http://membres.lycos.fr/coursgenetique>)

L'ADN étant le support moléculaire de l'information génétique, cette macromolécule doit être stable pour que le patrimoine génétique soit correctement maintenu et transmis. Cependant, l'ADN a une structure dynamique sujette à des erreurs spontanées ou à des lésions induites par des agents physico-chimiques génotoxiques. Les trois niveaux de structure de l'ADN jouent un rôle dans l'apparition des lésions puis des mutations. Les trois degrés d'altération de l'ADN sont les suivants :

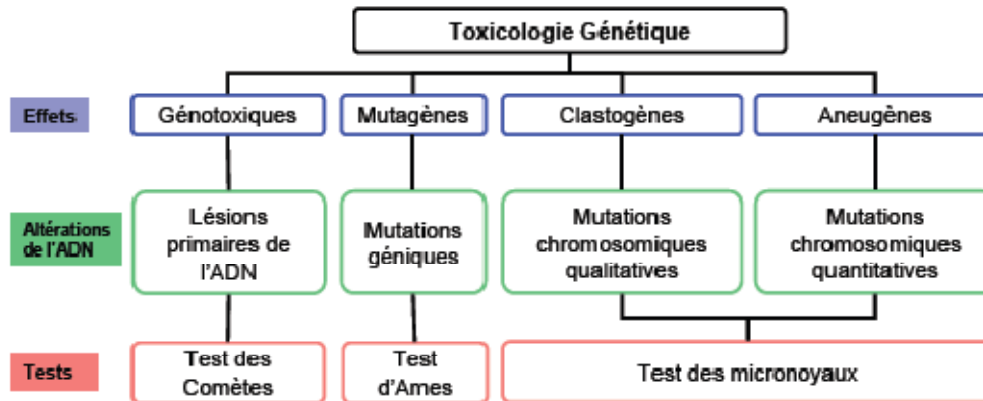
**Lésions primaires de l'ADN**(effets génotoxiques) correspondent à des ruptures de liaisons covalentes (cassures de brins) ou à la formation de liaisons covalentes (génération d'adduits, alkylations de bases, pontages inter ou intra brins).

**Mutations géniques**(effets mutagènes) apparaissent si les liaisons primaires de l'ADN font l'objet d'une mauvaise réparation. Ces mutations sont caractérisées par des délétions, insertions ou mutations d'une ou de quelques paires de bases au sein d'une séquence nucléotidique. Lorsque les mutations impliquent une seule paire de bases on parlera de mutations géniques alors que lorsque des dizaines ou des milliers de bases sont impliquées on parle de mutations chromosomiques de structure.

**Mutations chromosomiques**(effets clastogènes) correspondent à un certain nombre de lésions primaires de l'ADN sur les deux brins de la molécule d'ADN (ex : pontages interbrins). Il est plus difficile de réparer ces lésions car il n'existe pas de brin matrice natif sur la molécule d'ADN. Ces lésions et leurs prises en charge par les systèmes de réparations de l'ADN conduisent fréquemment à des cassures double-brin de la molécule d'ADN. Des délétions importantes et des phénomènes d'inversion et de translocation peuvent se produire, entraînant des anomalies chromosomiques de structure.

**Mutations génomiques**(effets aneugènes) correspondent aux modifications chromosomiques de nombre. Elles font suite à des lésions sur des protéines qui participent à l'établissement et au fonctionnement de l'appareil mitotique ou sur d'autres protéines impliquées dans les étapes clés du cycle cellulaire.

Il existe un grand nombre d'anomalies susceptibles de modifier le patrimoine génétique. Afin de vérifier cela différents tests de génotoxicité peuvent être réalisés comme le test d'Ames (sensibles aux mutations géniques), des micronoyaux (détecte les anomalies chromosomiques de nombre et de structure) et des comètes (détecte les lésions primaires de l'ADN)(Figure 29). Dans notre étude nous avons choisi de mettre en place le test des comètes qui semble être le plus adapté à notre problématique et à nos conditions expérimentales.

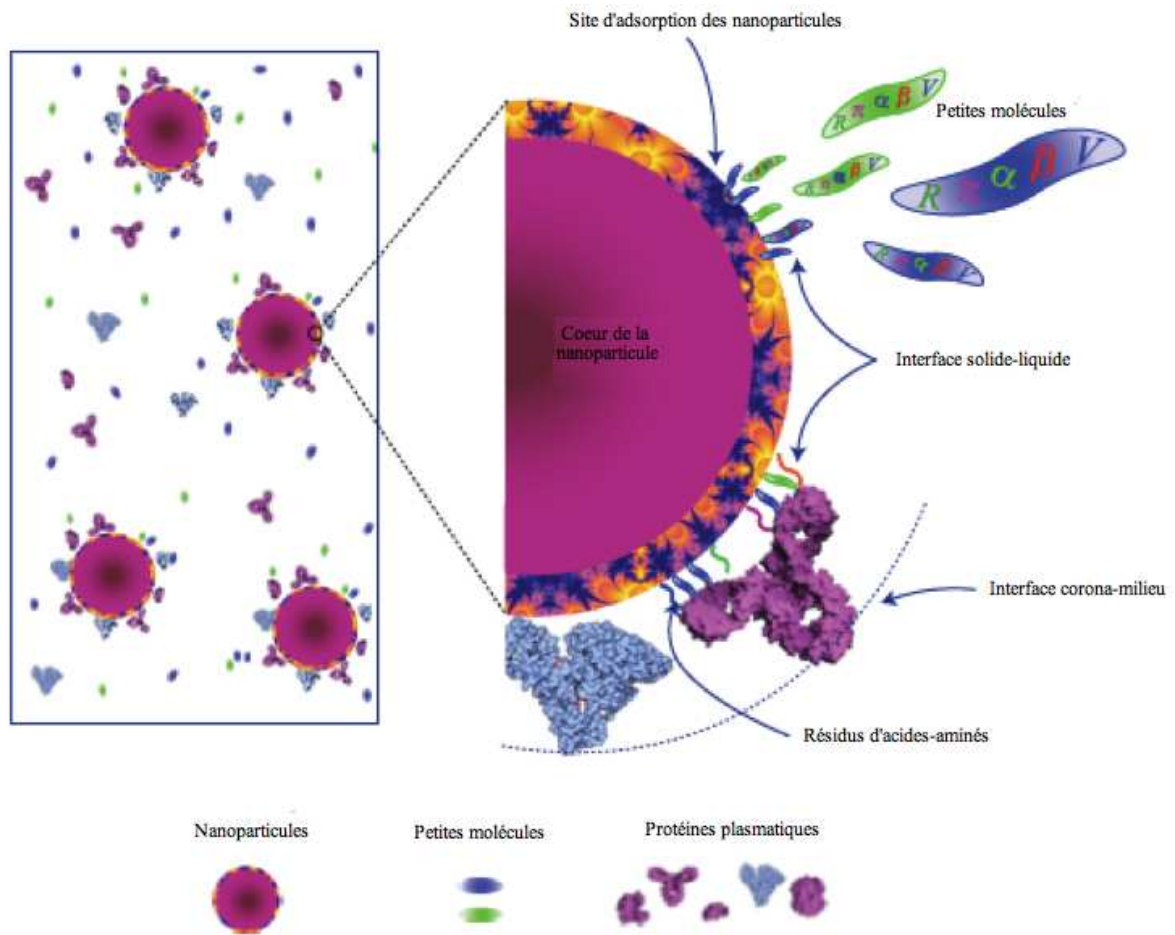


*Figure 29: Tests de génotoxicité effectués en fonction des altérations possibles de l'ADN en termes de lésions primaires, de mutations géniques, chromosomiques et génomiques (Auffan 2007)*

#### 1.1.3.4. Interactions protéines - nanoparticules

Un nouveau concept émerge concernant les interactions entre protéines et nanoparticules appelé « couche corona » (Figure 30). Cette couche dynamique des nanoparticules « couche corona » adsorbe des protéines provenant des milieux biologiques lors du contact avec les systèmes vivants. Plusieurs études ont été réalisées à ce sujet (I. Lynch & K. A Dawson 2008; A Nel et al. 2009). Certaines montrent que la réponse cellulaire à un matériau dans un milieu biologique dépend plus de la couche de biomolécule adsorbée que du matériau lui-même car ce phénomène entraîne une modification des propriétés physico-chimiques de la particule en question se répercutant sur la nature et l'intensité des interactions cellulaires.





**Figure 30: Illustration de la couche corona et des compétitions d'adsorption des petites molécules et protéines à la surface des nanoparticules (X.-R. Xia et al. 2010).**

Il est désormais admis que la caractérisation physico-chimique (granulométrie, la réactivité de surface, surface spécifique...) des nanoparticules est indispensable pour évaluer la toxicité des nanomatériaux. En effet, Warheit et al. ont montré que les particules nanométriques ( $\text{TiO}_2$ ) ne présentent pas un effet cytotoxique ou inflammatoire supérieur aux grosses particules de même composition après 90 jours d'inhalation (Warheit 2010). C'est pourquoi il est important de comprendre que l'estimation de la toxicité des nanoparticules ne peut pas simplement être fondée sur une mesure de la taille des particules et de la surface, l'interaction cellule particules doit être étudiée dans les milieux biologiques avec une évaluation plus spécifique des interactions entre biomolécules, particules et cellules. Des études récentes suggèrent une sous-estimation de la toxicité biologique en raison d'artefacts tels que l'adsorption de biomolécules sur les nanoparticules (Val 2009). Dans ce contexte, un nouvel aperçu de la toxicité potentielle induite par des nanoparticules pourrait être proposé grâce à la caractérisation des biomolécules adsorbées sur des nanoparticules qui modifient fortement l'identité biologique de la nanoparticule. En fait, ce concept « couche corona » qui représente la couronne protéique autour des nanoparticules a été introduit par Lynch et al. et Nel et al.

Elle correspond à une couche dynamique de protéines qui recouvre la surface des nanoparticules quand ils entrent en contact avec des liquides biologiques (I. Lynch & K. A Dawson 2008; A Nel et al. 2009). La composition de la couche dépend de l'affinité des différentes protéines (milieux de culture cellulaire : sérum de veau fœtal, albumine...) pour les nanoparticules, pour les cytokines libérées (par exemple lors d'une réaction inflammatoire). Ce n'est pas seulement la composition et l'organisation de la couche protéique qui intervient, mais le temps d'échange des protéines sur les nanoparticules ainsi que leur nature et leurs propriétés physico-chimiques. Il a été souligné que les réponses biologiques induites par les nanoparticules peuvent être, en partie, causées par le complexe nanoparticules-biomolécules. L'identité et la durée de vie de biomolécules sur la surface des nanoparticules peuvent affecter les cellules, et avoir des répercussions importantes notamment pour des considérations d'hygiène et sécurité en milieu industriel ou encore dans la pratique de la nanomédecine.

Basées sur le même concept, différentes études *in vitro* sur l'adsorption de cytokines ou de protéines sur les nanoparticules ont été réalisées confirmant l'impact important mais complexe à évaluer des biomolécules (Cedervall et al. 2007; Val 2009; Akhtar et al. 2010). Cedervall et al. introduisent une approche donnant la nature des protéines sur les nanoparticules (N-isopropyl-co-N-tertiobutylacrylamide) et l'échange avec des protéines plasmatiques (HAS : sérum albumine humaine). Val et al ont mesuré la capacité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de noir de carbone à adsorber différents cytokines inflammatoires: interleukine (IL-6), granulocyte monocyte (GM-CSF) et le TNF- $\alpha$ . Akhtar et al ont testé différentes particules en contact avec IL-8 en milieu acellulaire et montrent que les particules ayant des propriétés physico-chimiques différentes ont une capacité d'adsorption d'IL-8 différentes. En effet la quantité d'adsorption d'IL-8 est beaucoup plus importante lorsque le nombre de métaux présent dans l'échantillon augmente. Ces résultats tendent aux mêmes conclusions (Akhtar et al. 2010) : l'adsorption des protéines ou des cytokines sur les nanoparticules dépendent des caractéristiques de surface et de la taille des nanoparticules mais aussi de la nature de la biomolécule. En effet celle-ci aura une incidence sur la toxicité biologique.

Par ailleurs, Turci et al. ont utilisé un nouvel ensemble de techniques complémentaires pour caractériser et comparer l'adsorption de différentes protéines sur des nanoparticules de silice (Turci et al. 2010i). Les protéines étudiées ont été: l'albumine sérique bovine, le lysozyme d'œuf de poule, la ribonucléase pancréatique bovine A et la lactoperoxydase bovine. L'adsorption sur les nanoparticules de silice a été influencée par la charge nette de la protéine, alors que la distribution de charge de surface des protéines détermine l'affinité pour le support solide et la stabilité de l'adsorption des protéines sur les nanoparticules de silice. Enfin, Dell'Orco et al., Xia et al. utilisent des modèles prédictifs décrivant la cinétique de la

formation de la couche protéique (Dell'Orco et al. 2010; X.-R. Xia et al. 2010). Xia et al. utilisent un indice d'adsorption de surface biologique (BSAI) pour caractériser les propriétés d'adsorption des nanoparticules en quantifiant l'adsorption compétitive d'un ensemble de petites molécules sur des nanoparticules en imitant les interactions des molécules de la nanoparticule avec des protéines. Par ce moyen, les interactions protéiques peuvent être caractérisées par cet indice BSAI, qui régit également l'affinité et la sélectivité d'adsorption de biomolécules sur les surfaces des nanomatériaux dans les processus de la formation de la couche protéique. Ces résultats sont utilisés dans le cas de l'activité biologique afin de déterminer si les résultats obtenus sont corrects ou s'ils représentent un faux négatif en raison des artefacts tels que l'adsorption sur nanoparticules.

Ce phénomène d'adsorption est complexe puisqu'il est dépend des nanoparticules utilisées mais aussi du milieu biologique. Cependant il est toute fois nécessaire de le prendre en compte dans l'évaluation de l'activité biologique afin d'éviter les faux négatifs. Ce pourquoi dans le cadre de nos travaux nous proposerons un modèle de correction.

Afin de déterminer cette loi de correction nous procéderons par étapes en étudiant dans un premier temps les cytokines dégradées (TNF-  $\alpha$ ) durant l'évaluation biologique, les cytokines adsorbées (TNF-  $\alpha$ ) sur les supports utilisés ainsi que sur les nanoparticules puis nous réaliserons une cinétique d'adsorption des cytokines (TNF-  $\alpha$ ). Tout ceci nous permettra alors d'obtenir une loi de correction de ces artefacts applicables au TNF- $\alpha$  dans nos conditions expérimentales de contact cellules/particules.

#### **I.1.4. Etat de l'art sur la biotoxicité de la boehmite**

L'analyse du cycle de vie depuis la synthèse d'une nanoparticule, la commande et l'utilisation du produit, son avenir et sa dégradation permettent d'identifier les expositions potentielles aux nanoparticules. Nous pouvons distinguer les risques professionnels et les risques pour la population: soit directement, par l'utilisation du produit (surtout dans le cas de l'inhalation), soit indirectement via l'environnement.

Il est donc à titre préventif, important d'évaluer la toxicité des particules de boehmite. Actuellement la littérature ne référence que deux publications sur la toxicité des particules de boehmite (Pauluhn 2009; Pauluhn 2011) ainsi qu'un rapport faisant suite au projet « nanocare »(Kuhlbusch et al. 2009).

Pauluhn et al. mettent en avant le fait que les particules agglomérées inhalées de tailles micrométriques composées de particules primaires de tailles nanométriques peuvent exercer une toxicité pulmonaire selon la taille des agglomérats et non la taille des particules primaires. Ils ont étudié cette hypothèse à travers deux publications. Pour montrer cela, ils ont réalisé des

essais biologiques chez le rat en utilisant deux types de boehmite (AlOOH) composés de particules primaires de 10 ou 40 nm. Des rats ont été exposés par inhalation à différentes doses 0,4, 3, et 28 mg/m<sup>3</sup> durant 4 semaines (6 h / jour, 5 jours / semaine) suivie d'une période de post-exposition de 3 mois. Le diamètre aérodynamique médian en masse (MMAD) des particules agglomérées lors de l'inhalation a été de 1,7 et 0,6 µm. Des séries de sacrifices ont alors été réalisés dans le but d'étudier spécifiquement la toxicité pulmonaire à partir de lavage broncho-alvéolaire (LBA) et d'observations histopathologiques. La cinétique de rétention de l'aluminium a aussi été déterminée dans les tissus pulmonaires, et les organes extra-pulmonaires incluant les ganglions lymphatiques associés aux poumons (LALNs).

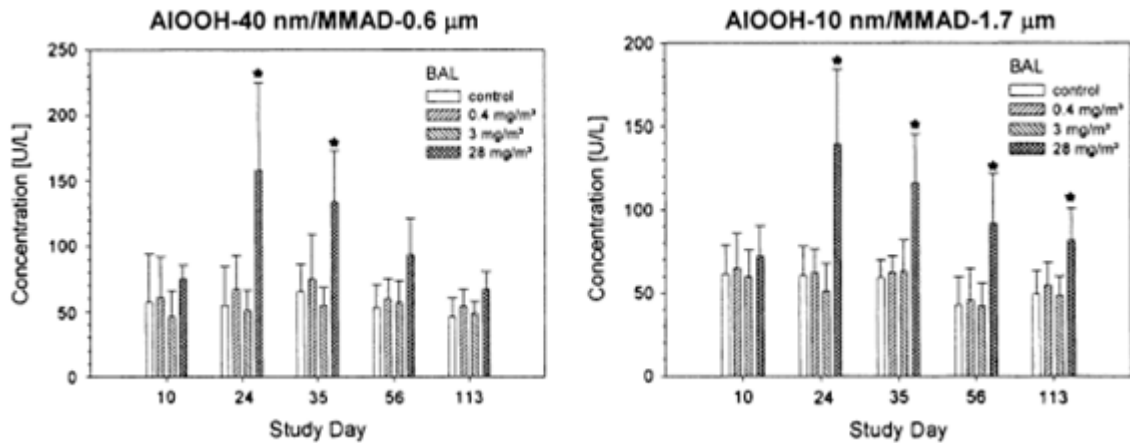
Les résultats ont montré des effets importants ayant entraîné des modifications dans la formule du lavage broncho-alvéolaire, le poumon et les ganglions lymphatiques pour la dose la plus forte de 28 mg /m<sup>3</sup>. L'histopathologie a ainsi révélé des macrophages alvéolaires élargis dont l'apparence est spumeuse ainsi qu'une augmentation de cellules épithéliales et inflammatoires. La détermination de l'aluminium dans le tissu pulmonaire montre que la dose cumulée dans le poumon était plus élevée après une exposition à AlOOH-40 nm/MMAD-0.6 µm que de AlOOH-10 nm/MMAD-1.7 µm, malgré les concentrations d'exposition identiques (Figure 31).

	AlOOH-40 nm/MMAD-0.6 µm			AlOOH-10 nm/MMAD-1.7 µm		
	Concentration (mg/m <sup>3</sup> )					
	0.4	3	28	0.4	3	28
Deposited alveolar fraction	0.105	0.108	0.103	0.063	0.067	0.065
Dose per day (µg Al/rat)	1.85	15.7	130	1.06	8.7	77.2
Lung tissue— <i>t</i> <sub>1/2</sub> (days)	56	43	144	42	60	295
BAL-cell— <i>t</i> <sub>1/2</sub> (days)	25	37	59	33	38	79
Lung tissue and total BAL-cell content combined— <i>t</i> <sub>1/2</sub> (days)	50	43	94	42	58	177

**Figure 31: Estimation de la fraction alvéolaire déposée et de la dose des aérosols inhalés d'AlOOH-40 nm/MMAD-0.6 µm et d'AlOOH-10 nm/MMAD-1,7 µm**

Remarque : Les paramètres cinétiques ont été calculés sur la base des concentrations d'aluminium des tissus en supposant une cinétique d'élimination de premier ordre de particules. Les concentrations tissulaires ont été examinées après une période de 4 semaines d'inhalation en utilisant un régime d'exposition de 6 h / jour, 5 jours / semaine.

Les réponses inflammatoires pulmonaires semblent être liées principalement à la taille des agglomérats, plutôt qu'à la taille des particules primaires (Figure 32).



**Figure 32: Comparaison de l'inflammation dans des lavages broncho-alvéolaires** Les rats ont été exposés pendant 4 semaines (6 h / jour, 5 jours / semaine) à AlOOH-40 nm /MMAD-0.6  $\mu\text{m}$  et à AlOOH-10 nm/MMAD-1.7  $\mu\text{m}$ . Les points de données représentent la moyenne  $\pm$  écart type de six rats mâles examinés à mi-parcours de la période d'étude (jour 10).

Ils ont aussi observé que malgré des charges pulmonaires élevées il ne semblait pas avoir de phénomène de biodistribution et biopersistance au niveau des organes extrapulmonaires quelle que soit la dose inhalée.

Il a été conclu que la toxicité pulmonaire dépendait de la taille de l'agglomérat plus que de la taille des particules primaires alors que la demi-vie des particules semble augmenter lorsque la taille des particules primaires diminue.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors d'un projet « Nanocare » à l'initiative allemande sur les aspects sanitaires des nanoparticules synthétiques (Kuhlbusch et al. 2009). Il s'est déroulé de 2006 à 2009 et a visé à élargir les connaissances sur les nanomatériaux synthétiques à l'égard des impacts potentiels des nanomatériaux sur la santé humaine. Ils ont travaillé sur divers types de nanoparticules et notamment la boehmite.

Les particules de boehmite utilisés lors de leurs tests sur des modèles animaux (rat) montrent des agglomérats de 40  $\mu\text{m}$ , des particules primaires de 40nm et une surface spécifique de  $100\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ . Après une exposition semblable aux travaux de Pauluhn, les résultats obtenus montrent une augmentation de l'inflammation proportionnelle au degré d'exposition.

Au cours de ce projet, différents tests *in vitro* ont également été réalisés sur deux lignées cellulaires différentes (lignée carcinomateuse pulmonaire A549 et macrophages RAW 264.7). Concernant les particules de boehmite, les résultats obtenus sur la lignée RAW 264.7 montrent seulement l'expression de HO-1 (hème oxygénase 1) qui est induit en réponse à divers stress (hypoxie, cytokines...). Cependant pour l'autre lignée cellulaire A549 ils ont constaté en plus une cytotoxicité et une sécrétion d'IL-8.

Au vu de ces travaux et du nombre très limité d'études sur les particules de boehmite, il apparaît indispensable d'étudier de façon plus approfondie la biotoxicité de ce types de particules.

### **I.1.5. Activité biologique**

L'appareil respiratoire comprenant de nombreuses cellules, nous avons choisi de travailler sur les macrophages qui représente la cellule cible alvéolaire majeure de part sa fonction de défense de l'organisme (définis paragraphe 0) pour évaluer la biotoxicité des nanoparticules de boehmite. Au cours de ces travaux et en fonction des études réalisées dans le domaine ou selon les programmes de recherche de type Nanoimpact, nous avons choisi de réaliser une approche multiparamétrique de la toxicité biologique sur la base de trois paramètres : l'état d'inflammation, la mort cellulaire et le stress oxydant qui seront détaillé dans les paragraphes suivants.

#### **I.1.5.1. Etat d'inflammation**

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité. L'inflammation est un processus habituellement bénéfique afin de mobiliser le système immunitaire pour éliminer l'agent pathogène et réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire et conduire dans ce cas de figure à un processus de nécrose.

Les médiateurs pro-inflammatoires et immuno-régulateurs sont constitués des cytokines principalement sécrétées par les cellules effectrices du système immunitaire dont le macrophage. Seuls le TNF- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor) et les interleukines IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8, jouent vraisemblablement un rôle majeur dans la plupart des maladies inflammatoires. Dans cette étude nous nous focaliserons sur le macrophage dont l'état d'activation se caractérise précocement par une production de TNF-  $\alpha$ .

#### **Le Tumor Necrosis Factor (TNF)**

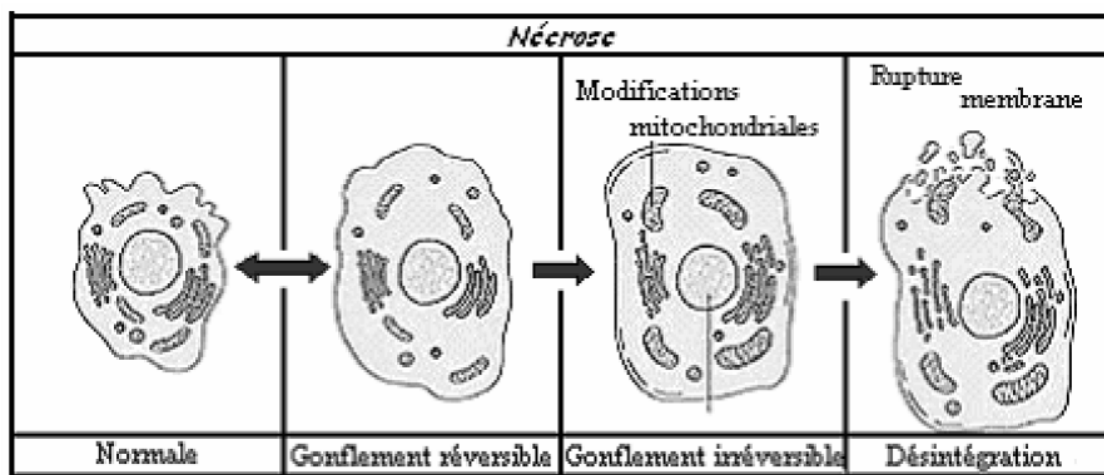
Le TNF existe sous deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$ . Le TNF- $\beta$  (ou lymphotoxine- $\alpha$ ), essentiellement sécrété par les lymphocytes T activés, est l'isoforme le moins actif. Nous étudierons ici le TNF- $\alpha$  dont l'implication dans les maladies inflammatoires est certaine (Bradley 2008). Le TNF- $\alpha$  est une protéine soluble non glycosylée de 17 kDa constituée de 157 acides aminés.

Il existe différents modes d'actions du TNF- $\alpha$  : action sur le système nerveux central, activation cellulaire, induction de médiateurs solubles, induction de récepteurs de surfaces, activité pro coagulante. Lors de l'activation cellulaire, le TNF- $\alpha$  active de nombreuses cellules du système immunitaire ; les macrophages sont à la fois la source principale de TNF- $\alpha$  mais aussi une cible. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle dans la différenciation et l'activation des cellules, il exerce un chimiotactisme sur les monocytes (Amin 2004).

#### 1.1.5.2. Mort cellulaire ou cytotoxicité

Il existe deux types majeurs de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose.

La nécrose est une mort cellulaire dite "accidentelle" qui survient lors d'un dommage cellulaire (Figure 33). La cellule gonfle, puis la membrane cellulaire éclate, déversant le contenu cellulaire dans le tissu environnant et provoquant l'inflammation du fait des enzymes et autres molécules pro-inflammatoires contenues dans le cytoplasme. Les mitochondries gonflent et subissent des lésions irréversibles (Carmaux 2008).



**Figure 33: Les modifications morphologiques de la nécrose (Roche Diagnostics)**

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est une forme physiologique de mort cellulaire hautement régulée (Figure 34). Elle est nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Les cellules d'organismes multicellulaires s'autodétruisent lorsque celles-ci ne sont plus utiles, lorsqu'elles sont endommagées ou dysfonctionnelles. L'apoptose implique habituellement des cellules individuelles dans un tissu et ne provoque pas l'inflammation car il y a maintien de l'intégrité membranaire contrairement à la nécrose (Carmaux 2008).

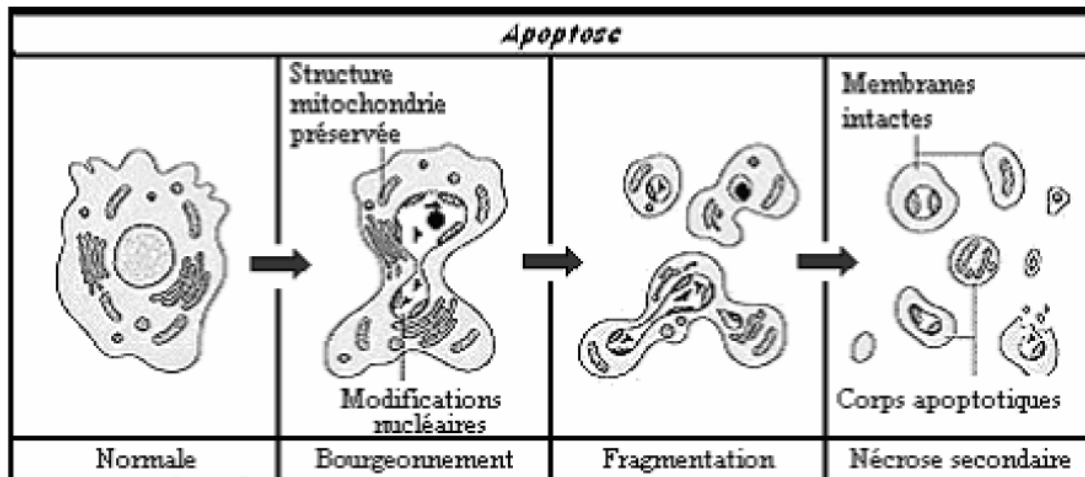


Figure 34: Les modifications morphologiques de l'apoptose (Roche Diagnostics)

L'indicateur le plus employé pour la mesure de la mort cellulaire est la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme présente dans toutes les cellules de l'organisme.

#### La Lactate DésHydrogénase (LDH)

Le dosage de la LDH permet d'évaluer l'intégrité membranaire. Les cellules dont la membrane a été perméabilisée ou lysée, libèrent leur contenu cytosolique, et notamment l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), dans le milieu extracellulaire. La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle au nombre de cellules mortes (après évaluation du contenu en LDH d'une cellule viable).

La mesure de l'activité LDH permet d'évaluer non seulement la mort cellulaire nécrotique (caractérisée par une rupture précoce de la membrane plasmique) mais aussi une partie de la mort cellulaire apoptotique : les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées (*in vitro*) et finissent par perdre leur intégrité membranaire au stade ultime du processus apoptotique ("nécrose secondaire").

#### 1.1.5.3. Stress oxydant

Le stress oxydant est dû à un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydantes. Des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire peuvent être provoqués par les radicaux libres en dégradant par exemple de nombreuses molécules cibles (protéines, lipides et acides nucléiques).

Ces radicaux libres possèdent un électron célibataire (ou non apparié). Le champ magnétique créé par sa rotation, ou spin, n'est alors pas compensé par la rotation en sens



inverse d'un électron apparié. Cette propriété donne aux radicaux libres la capacité de réagir avec différentes molécules, notamment lors de réactions en chaîne.

Plusieurs facteurs peuvent produire le stress oxydant : environnement, exposition au soleil, à l'ozone, tabagisme, consommation excessive d'alcool, contact avec des agents cancérigènes, consommation de médicaments, pollution... De plus l'organisme produit des agents pro-oxydants. Ces espèces pro-oxydantes s'accompagnent d'un rôle physiologique important. Elles possèdent une haute réactivité, elles régulent le phénomène d'apoptose, en entraînant la mort de cellules évoluant vers un état cancéreux. Elles activent aussi des facteurs de transcription, eux-mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (phagocytose). Elles peuvent encore moduler l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes. Lorsque les espèces pro-oxydantes sont trop présentes dans l'organisme, elles entraînent des dégâts cellulaires importants, souvent irréversibles, tels que la cassure et la mutation de l'ADN, l'inactivation des protéines et des enzymes, l'oxydation de sucres ou encore la peroxydation lipidique au sein d'acides gras polyinsaturés.

### Radicaux libres

Les radicaux libres ayant une courte durée de vie, ils réagissent quasiment instantanément avec d'autres molécules voisines. Cependant, la toxicité d'une espèce n'est pas nécessairement corrélée à sa réactivité. Certaines molécules non-radicalaires peuvent présenter une activité oxydante accrue parmi lesquelles le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) ou l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ). Ainsi, les espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) et les espèces réactives de l'azote (RNS : Reactive Nitrogen Species) peuvent être classées en deux catégories : les radicaux libres et les non-radicaux (Figure 35).

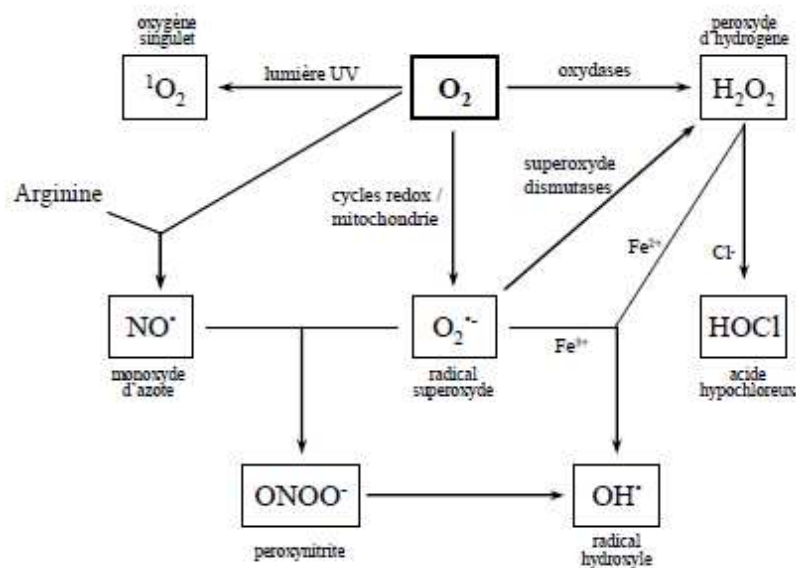


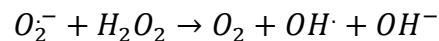
Figure 35: Mécanisme de production des ROS et des RNS (Barus 2008)

Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

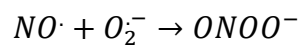
Les ROS comprennent le radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ) sont les ROS les plus toxiques car ils sont très réactifs. Ce sont de puissants agents oxydants qui s'attaquent à la plupart des molécules organiques et inorganiques présentes dans les cellules, parmi lesquelles l'ADN, les protéines, les lipides, les acides aminés, les sucres et les métaux. Ils agissent selon trois modes d'actions : en arrachant soit un électron soit un atome d'hydrogène ou encore en s'additionnant sur les doubles liaisons. Les radicaux superoxydes  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sont peu réactifs vis-à-vis des molécules biologiques (acides nucléiques, protéines, lipides...). Ainsi, les cibles privilégiées de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sont peu nombreuses. Nous pouvons citer les superoxydases dismutases (SOD), les ions  $\text{Fe}^{3+}$  ou encore l'ascorbate.

Les radicaux  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sont des espèces potentiellement toxiques via leurs réactions avec le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et le monoxyde d'azote ( $\text{NO}\cdot$ ), générant respectivement des radicaux  $\text{OH}\cdot$  et des peroxynitrites ( $\text{ONOO}^-$ ). Ces deux espèces sont particulièrement réactives vis-à-vis des cibles biologiques.

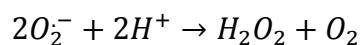


*Équation I-1*



*Équation I-2*

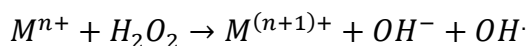
Enfin, la dismutation spontanée des  $\text{O}_2^{\cdot-}$  conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène (Halliwell & Gutteridge 1999).



*Équation I-3*

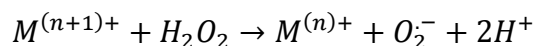
Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) cause d'importants dommages cellulaires à concentration relativement faible. Du fait de sa forte solubilité dans l'eau, il pénètre facilement les membranes biologiques, entraînant la dégradation des protéines, l'inactivation d'enzymes et l'oxydation de l'ADN, de lipides ou encore de thiols.

Le mécanisme le plus fréquemment impliqué dans la génération des radicaux libres  $\text{OH}\cdot$  en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est la réaction de Fenton:



*Équation I-4*

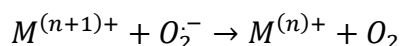
Une autre réaction possible conduit à la production d'un radical anion superoxyde par interaction de  $M^{(n+1)+}$  avec le peroxyde d'hydrogène :



*Équation I-5*

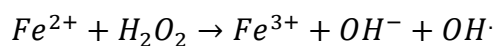
Une nouvelle molécule d'eau oxygénée peut réagir avec le radical  $O_2\cdot^-$  et entraîner la formation d'un radical  $OH\cdot$  (Équation I-1):

Le radical  $O_2\cdot^-$  peut à nouveau réagir avec  $M^{(n+1)+}$  en le réduisant en  $M^{n+}$  suivant l'équation suivante :



*Équation I-6*

Lequel peut alors donner la réaction de Fenton. L'application au fer permet d'obtenir l'équation suivante (B. Fubini & A. Hubbard 2003):



*Équation I-7*

Le radical  $OH\cdot$  sera dosé au cours de notre étude lors du contact particules et cellules pour mesurer le stress oxydant.

Espèces réactives de l'azote (RNS)

Le monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ) est issu de l'oxydation de l'un des azotes terminaux de l'acide aminé L-Arginine.  $NO\cdot$  peut conduire à la formation de nitrite ( $NO_2^-$ ) ou de nitrate ( $NO_3^-$ ) en réagissant par exemple avec  $H_2O_2$ . Le peroxyde de nitrite ( $ONOO^-$ ) est formé suite à la réaction entre  $O_2\cdot^-$  et  $NO\cdot$ . La forme protonnée du radical peroxyde de nitrite ( $ONOOH$ ) est un puissant agent oxydant causant des dommages importants similaires à ceux observés avec  $OH\cdot$  (Delattre et al. 2005; Barus 2008).

Sources métaboliques de ROS et de RNS

Les mitochondries (respiration mitochondriale), les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages) sont des sources métaboliques de ROS et de RNS. Elles

participent à la défense immunitaire de l'organisme. Suite à des réactions biochimiques, des radicaux libres peuvent également être produits au cours de la synthèse de molécules.

#### **Systèmes de défense : les molécules antioxydantes**

L'organisme possède plusieurs systèmes de défenses afin de lutter contre les dommages oxydants, comme les systèmes de réparation (enzymes réparatrices de l'ADN) ou d'élimination de molécules endommagées par les ROS. Il y a les systèmes de prévention qui empêchent la formation de radicaux libres (ex : chélation des métaux de transition). Il y a les protéines telles que l'albumine ainsi que les hormones (œstrogènes ou mélatonine) qui participent à la lutte contre le stress oxydant. Et enfin, les antioxydants qui assurent une protection des sites biologiques. Leur efficacité est due au fait d'une élimination directe des molécules pro-oxydantes. Il existe trois familles d'antioxydants : enzymatiques (catalase, glutathion peroxydase), moléculaires naturels (vitamine E, C,  $\beta$ -carotène...) et synthétiques (le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle))(Delattre et al. 2005; Barus 2008).

#### **Conséquences du stress oxydant sur l'organisme**

Le stress oxydant peut entraîner des complications diabétiques ainsi qu'une résistance à l'insuline (Delattre et al. 2005). Il entraîne aussi la production de molécules biologiques défaillantes voire cancéreuses et à la surexpression de certains gènes. Il est donc à l'origine de très nombreuses maladies telles que la cataracte, la sclérose, le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'œdème pulmonaire ainsi que le vieillissement accéléré des tissus (Sohal et al. 2002), les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. D'après Perry et al. les ROS seraient impliquées dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer (G. Perry et al. 2002) où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres.

Le stress oxydant joue aussi un rôle important dans la cancérogénèse. Les radicaux libres interviennent dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes. Ces molécules carcinogènes vont créer des lésions de l'ADN, amplifier les signaux de prolifération et inhiber des gènes suppresseurs de tumeurs. Ce paramètre est donc indispensable dans les études en condition aiguë et chronique (Barus 2008).

#### **Stress oxydant lors de l'interaction particules/cellules**

C'est l'équipe de B.Fubini (B. Fubini & A. Hubbard 2003f) qui a mis en évidence la production de ROS à la surface des particules mais aussi par les cellules phagocytaires. Les ROS produits de façon normale par le métabolisme de l'oxygène sont fortement réactifs à cause de la présence d'électrons de valence libre et sont impliqués dans les mécanismes de signalisation cellulaire, d'apoptose et de prolifération cellulaire. La revue de la littérature de

l'équipe de M.R. Gwinn et al. (Gwinn & Vallyathan 2006) confirme que les ROS sont impliqués dans la transduction de signaux chez les macrophages. Cependant, pendant des périodes de stress environnemental, le niveau des ROS peut augmenter considérablement provoquant des dommages significatifs à la structure des cellules. Ce phénomène est connu sous le nom de stress oxydant. Il apparaît que la surface de la particule joue un rôle crucial sur la réponse biologique et qu'il y a une extrême variabilité du potentiel pathogénique suivant la source de silice ou autre nanoparticule.

## **I.2. Nanoparticules étudiées : la boehmite**

### **I.2.1. Boehmite**

Dédiée à la mémoire du savant Johann Böhm (1895-1952) qui fut le premier à l'identifier, la boehmite est le constituant essentiel des bauxites françaises en association avec la gibbsite. Elle est donc d'origine naturelle mais peut cependant être obtenue en laboratoire selon différentes méthodes de synthèse.

#### **I.2.1.1. Propriétés générale de la boehmite**

La boehmite est l'oxyhydroxyde gamma de l'aluminium, il a pour formule  $\text{AlO}(\text{OH})$ . Cette formule est identique à celle du diaspore mais ces deux composés se distinguent entre eux par leur structure cristalline et par la nature des produits obtenus après traitement thermique. Il fait partie de la famille des alumines.

L'alumine est un matériau peu coûteux. Les poudres sont disponibles commercialement sous différentes propriétés : morphologie des grains, granulométrie et pureté. Le choix de la poudre va dépendre surtout de l'usage. Par exemple, les produits frittés nécessitent généralement des alumines fines et réactives, pour satisfaire à des critères microstructuraux très précis, notamment une densité optimale et des grains fins ; les réfractaires, des alumines tabulaires dont la taille conséquente des cristaux permet de limiter le fluage et réduire les réactions avec l'environnement et abouti à un matériau poreux résistant mieux aux chocs thermiques. L'alumine possède diverses applications :

- mécanique : abrasif, plaquette d'outil de coupe (pour les métaux durs et oxydés), ou sous forme de buses, de filières d'extrusion, de joints entre pièces mobiles (robinets mitigeurs), ou encore dans les têtes de prothèses de hanches et les implants dentaires, ces deux exemples montrent sa forte compatibilité biologique.

- réfractaire : garnissage intérieur des fours, creusets, soles, enrobage de thermocouples.

- isolant : bougies d'allumage pour automobiles, substrats isolants destinés au dépôt des circuits électroniques.

- optiques : monocristaux de saphir dans la joaillerie, guides d'ondes dans le domaine des lasers, fenêtre transparente des lecteurs de codes barres : sous forme polycristalline, elle trouve son application la plus célèbre dans le tube des lampes à vapeur de sodium d'éclairage public ou des tunnels.

Les alumines hydratées sont utilisées, hormis dans la métallurgie de l'aluminium ou la catalyse, comme charge dans les papiers, en traitement des eaux, ou encore comme abrasif doux dans les pâtes dentifrice et comme pansement gastrique (Belnou 2002).

#### 1.2.1.2. Structure cristallographique

La structure de la boehmite est orthorhombique lamellaire. Du point de vue structural le cristal de la boehmite est formé d'ions  $Al^{3+}$  entourés par des octaèdres irréguliers d'oxygènes. Ces octaèdres sont joints les uns aux autres de façon à former une double couche par emboîtement en ayant des faces communes deux à deux. Ces doubles couches sont liées entre elles par des ponts hydrogènes qui forment des rangées parallèles de chaînes en zig-zag le long de l'axe b du cristal. Chaque double couche d'octaèdre constitue un réseau compact cubique mais la structure de la maille entière n'est pas compacte. Il y a 4  $AlOOH$  par maille et 2  $AlOOH$  par motif (Figure 36).

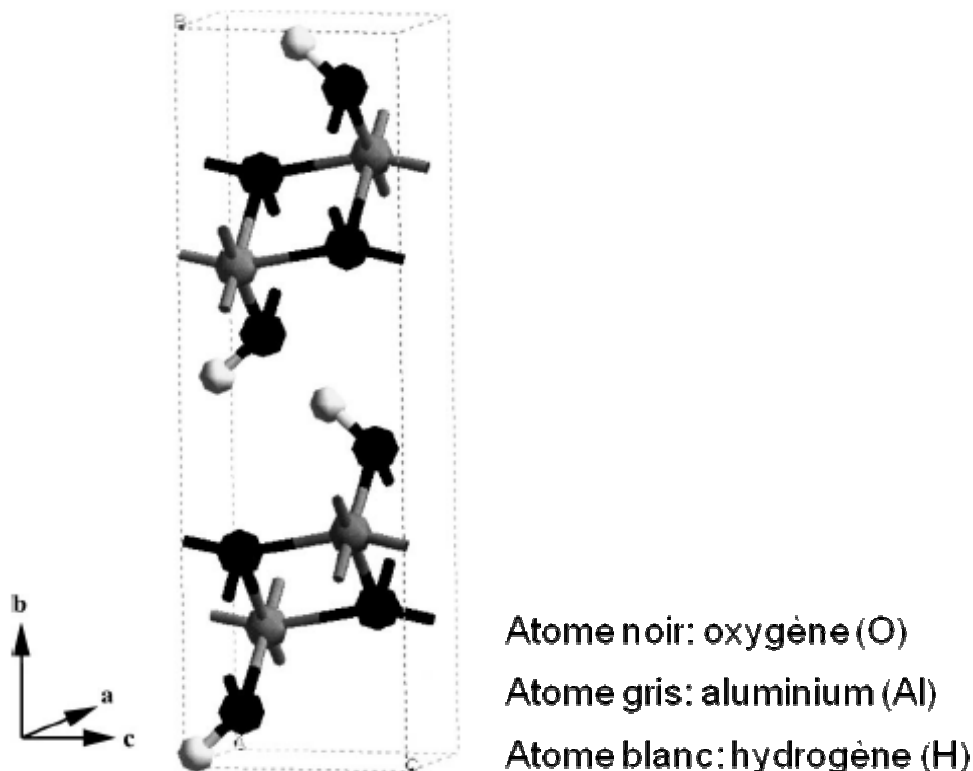


Figure 36: Structure cristallographique de la boehmite (Raybaud et al. 2001)

### **I.2.2. Procédés de synthèse**

Les procédés de synthèse des particules fournis par notre partenaire industriel étant confidentiels, nous présenterons brièvement quelques procédés existant et dans une dernière partie nous définirons le procédé de synthèse hydrothermale. Celui permettra de produire une partie des particules étudiées.

Il existe différents procédés de synthèse de la boehmite cités dans la littérature. Il semble simple d'arriver à la précipitation de cet oxyhydroxyde d'aluminium mais plutôt difficile d'obtenir un produit pur au sens structural. De plus il est assez fréquent d'obtenir une co-précipitation de bayérite, pseudo boehmite et boehmite (Pernot-Gehin 2007).

Les différentes méthodes de synthèse qui permettent d'obtenir de la boehmite sont les suivantes :

- Hydrolyse d'alkoxyde d'aluminium (Yoldas 1973, Yoldas 1975b, Yoldas 1975c, Yoldas 1975a; Music et al. 1999),
- Technique des deux émulsions inverses (Naskar & Chatterjee 2005),
- Spray pyrolyse (Gurav et al. 1993; Messing et al. 1993; Pratsinis & Vemury 1996).

Pour chacune de ces méthodes, des paramètres tels que la température, la concentration des réactifs, l'agitation doivent être strictement contrôlés pour aboutir à la forme désirée d'hydroxyde d'aluminium.

#### **I.2.2.1. Procédé sol-gel de B.E. Yoldas**

La méthode la plus couramment employée pour la synthèse de boehmite est la méthode mise au point par B.E. Yoldas (Yoldas 1973, Yoldas 1975b, Yoldas 1975c, Yoldas 1975a; Music et al. 1999). Ce procédé sol-gel se décompose en 3 étapes principales (Figure 37):

- Hydrolyse (et condensation) d'un alkoxyde d'aluminium avec un excès d'eau pour former un hydroxyde d'aluminium
- Redissolution du précipité obtenu par peptisation acide pour former le sol
- Formation du gel par séchage du sol préalablement formé

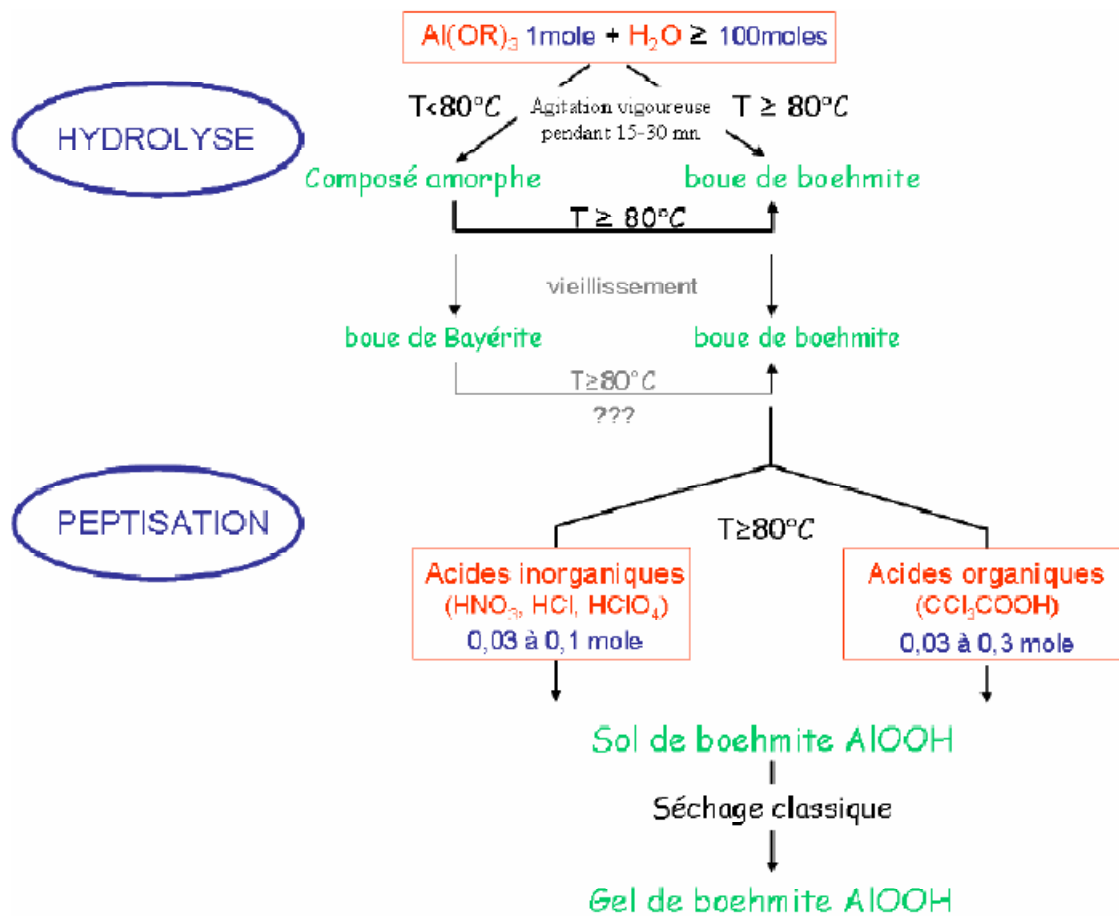


Figure 37: Conditions optimales pour la précipitation de boehmite suivant le procédé sol-gel de B.E. Yoldas(Pernot-Gehin 2007)

#### 1.2.2.2. Techniques des deux émulsions inverses

L'avantage de cette méthode est de produire des nanoparticules de boehmite. La figure suivante(Figure 38) montre les principales étapes de cette méthode.



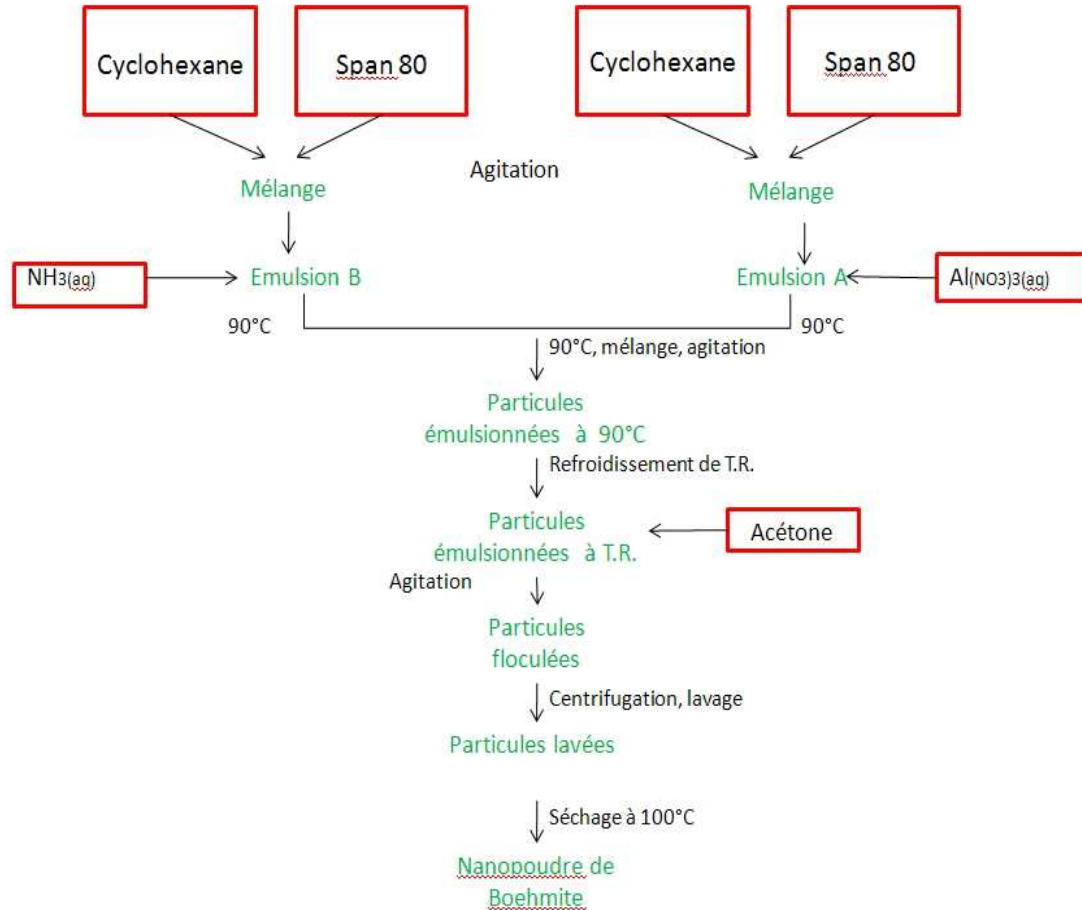


Figure 38: Diagramme de la formation de nanoparticules de boehmite (Naskar & Chatterjee 2005)

Cette méthode s'appuie tout d'abord sur la fabrication de solutions de nitrate d'aluminium et du solvant qui est un mélange de cyclohexane avec du span 80 (sorbitane monooléate ayant une balance hydrophile-lipophile de 4.3, il est utilisé comme émulsifiant dans cette synthèse).

La seconde étape consiste à préparer une émulsion A inverse (w/o) de solution de nitrate d'aluminium. Celle-ci est préparée à température ambiante par ajout d'une solution de sel au solvant dans un récipient en verre fermé sous agitation de 500 rpm. Le ratio en volume de sel/solvant est de  $\frac{1}{4}$ .

Ensuite l'émulsion B est préparée à son tour par ajout à température ambiante d'une solution d'ammoniac dans le solvant dans un récipient en verre sous agitation de 500 rpm. Le ratio en volume de la solution d'ammoniac/solvant est de  $\frac{1}{4}$ .

Les deux émulsions sont conservées dans un bain d'huile de 90°C et gardées à cette température pendant 10 min sous agitation de 500 rpm. Lorsque la température de 90°C est obtenue, l'émulsion B est rapidement ajoutée à l'émulsion A toujours sous agitation pour obtenir une simple émulsion inverse (w/o) suivie d'une précipitation simultanée de précurseur de poudres. L'agitation est maintenue pendant les 10 minutes suivantes après que le flacon de verre ait été placé dans un bain et refroidi à température ambiante. Les particules synthétisées

sont obtenues par ajout d'un volume connu d'acétone. La séparation immédiate des particules se produit alors, et les particules peuvent être collectées après centrifugation à 6000 rpm. Afin d'enlever les dernières traces d'impuretés cette procédure est répétée 2 fois. Les particules lavées sont séchées à 100°C et les nanopoudres de boehmite sont alors obtenues (Naskar & Chatterjee 2005).

#### 1.2.2.3. Spray pyrolyse

La technique de spray pyrolyse est un procédé couramment utilisé pour former une large variété de matériaux sous forme de poudre dont les métaux, les oxydes métalliques, les céramiques, les supraconducteurs, les fullerènes. Le spray pyrolyse offre des avantages spécifiques par rapport à d'autres procédés de transformation gaz-particules, solides ou liquides. Il y a comme avantages une pureté supérieure, une meilleure uniformité de la composition chimique, une étroite distribution de taille, une meilleure régularité dans la forme et la synthèse de matériaux multi-composants. Un autre avantage est la relative simplicité du procédé (Messing et al. 1993; Gurav et al. 1993; Pratsinis & Vemury 1996) (Figure 39).

La solution de précurseur est préparée selon la méthode établie par Yoldas B (Yoldas 1975a, Yoldas 1975c). L'aluminium-tri-sec-butoxyde est ajouté à l'eau distillée (300 mL) à 80°C. Après 2 h d'agitation, l'acide nitrique est ajouté comme agent peptisant. Ce sol est très stable. Avant le traitement, le sol est dilué à la concentration 0,2 mol / L de  $Al^{3+}$ .

Le dispositif spray pyrolyse est schématisé dans la figure suivante. L'aérosol est généré par des vibrations ultrasonores d'une pastille piézo-électrique (2,4 MHz) immergée dans la solution de précurseur. Les gouttes sont recueillies par un flux d'air ( $0.3m^3 / h$ ) et entraînées dans une aire de séchage maintenue à 100 - 120 ° C, puis dans une zone de décomposition-densification où la température est maintenue à une valeur pouvant aller jusqu'à 1200 °C. Les collections de poudres sèches sont obtenues par un collecteur électrostatique.

Le temps de séjour des gouttelettes dans la zone de chauffage est d'environ 3-4 s. Les réacteurs sont en pyrex ou en quartz en fonction de leur température de travail. Le flux (gaz vecteur + solvant et décomposition vapeurs de produits + particules solides) est ensuite élaboré dans un précipitateur électrostatique composé de deux plaques de collection dans un tube de quartz. Un fil métallique de 5 mm est maintenu à 12 kV. Le flux dans le précipitateur est maintenu à environ 130 ° C. 500 ml de précurseurs sont pulvérisés en 4 heures, ce qui donne environ 5 g de boehmite hydratée.

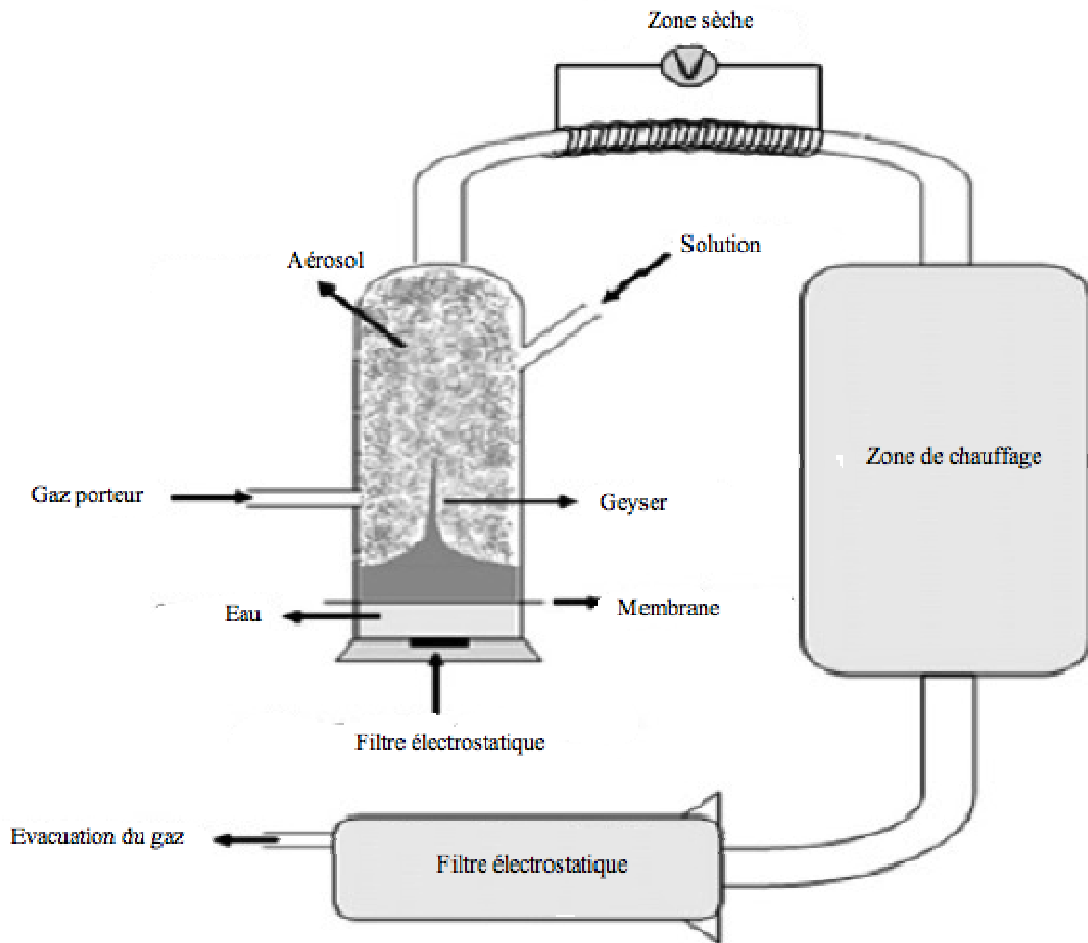
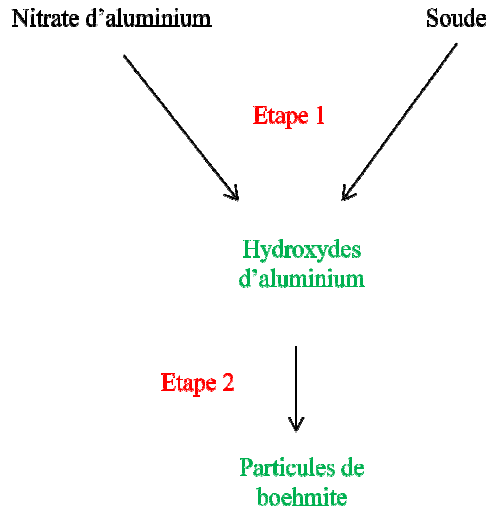


Figure 39: Schéma du dispositif de Spray Pyrolyse (Caiut et al. 2009)

#### 1.2.2.4. Synthèse hydrothermale de particules de boehmite

Au cours d'une première étape des hydroxydes d'aluminium amorphes ont été précipités à partir de nitrate d'aluminium et de soude, avant d'être cristallisés dans différentes conditions hydrothermales (étape 2), en contrôlant la température et le temps de mûrissement principalement, afin d'avoir une gamme de taille de particules (Figure 40).



**Figure 40: Synthèse hydrothermales des particules de boehmite**

Les différentes conditions d'expériences sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 2) reprenant les conditions de pH, de température de chaque étape et de lavage (L), le temps de rampe (r) et plateau (p) à la température de cristallisation, et le type de réacteur: chauffage micro-ondes (MO), autoclave (A) ou réacteur continu tubulaire (T).

Echantillons	pH1	T1	pH2	T2	t2(r+p)	Dispositif
1	5	25	L, 9	180	10+10	MO
2	5	25	5	150	10+10	MO
3	5	25	9	150	10+10	MO
4	5	25	9, L, 9	180	10+10	MO
5	5	25	9, L, 9	180	10+90	MO
6	9	60	-	-	-	-
7	9	25	L, 9	180	45+5	A
8	9	25	L, 9	180	1+5	T

**Tableau 2: Conditions expérimentales des synthèses de boehmite**

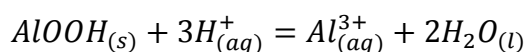
Ces synthèses entraînent trois niveaux de cristallisations différentes :

- faible cristallisation : pas de cristallisation ou à faible température 150°C (poudres 6, 2 et 3)
- moyenne cristallisation : température de cristallisation de 180°C pendant une courte durée 5 à 10 min (poudres 1, 4 et 8)

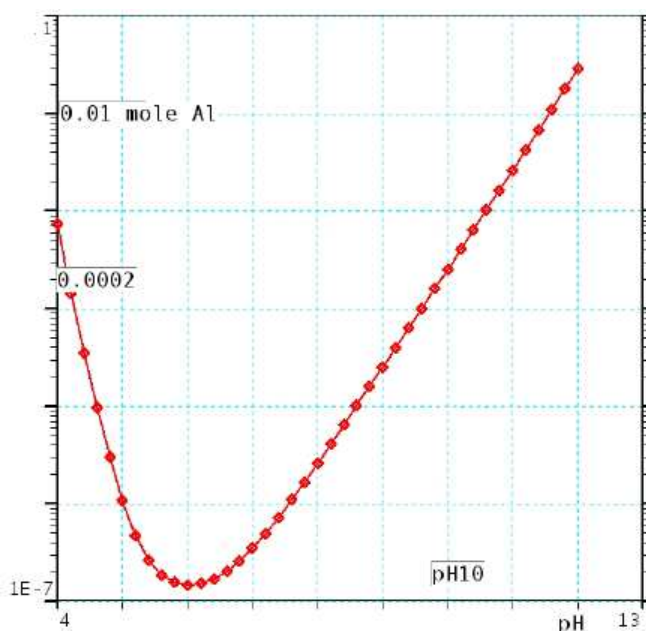
- forte cristallisation : température de cristallisation de 180°C pendant des longues durées supérieures à 45 min (poudres 5 et 7).

### **I.2.3. Solubilité de la boehmite**

Plusieurs études montrent que la solubilité de la boehmite est faible (Peryea & Kittrick 1988; Castet et al. 1993; Pernot-Gehin 2007). Celle-ci dépend fortement du pH de la solution. En effet en présence de solutions acides (pH <4), la boehmite se dissout dans l'eau en formant de l'hydrogène et des ions trivalents  $Al^{3+}$ .



*Équation I-8*



**Figure 41: Diagramme de dissolution de l'aluminium (mole/kg d' $H_2O$ ) en équilibre avec boehmite à 25°C (calcul ARXIM ; base de données SUPCRT)**

D'après la Figure 41, la solubilité de la boehmite à 25°C dans l'eau pure (pH6,8) est de l'ordre de 0,005ppm.

Ces ions trivalents peuvent être absorbés par l'intermédiaire de la nourriture (eau, légumes...), par inhalation ou par contact avec la peau (déodorants). Une importante exposition peut alors entraîner de sérieux problèmes de santé comme des dommages au niveau du système respiratoire central, démences, perte de mémoire, apathie ou encore tremblements.  $Al^{3+}$  est aussi impliqué dans les maladies neurodégénératives ce qui entraîne des problèmes avec les adjuvants vaccinaux. La présence d'aluminium est donc réglementée à 200µg/L dans l'eau par exemple (Gourirer-Fréry 2003).

### **L'aluminium**

L'aluminium est le troisième élément constituant l'écorce terrestre. Il représente près de 8 % de la composition de la lithosphère après l'oxygène (42 %) et le silicium (28 %).

C'est un métal très réactif qui ne se retrouve pas à l'état libre dans l'environnement mais combiné à d'autres éléments pour former des composés. Le plus souvent se sont des oxydes, l'aluminium est donc insoluble.

L'aluminium peut être retrouvé dans les végétaux, les eaux aussi bien souterraines que de surface. L'homme est ainsi exposé à l'aluminium d'origine naturelle par contact direct avec les sols, l'air, l'ingestion d'aliments provenant de la terre et l'eau de source.

Au vu des nombreuses propriétés physico-chimiques de l'aluminium (basse densité, grande malléabilité, grande ductilité, bonne conductivité électrique et chimique, résistance à la corrosion, à la traction...), il est utilisé pour des applications variées notamment dans l'industrie du bâtiment, des transports dans l'agroalimentaire (conservation, colorants, additifs, etc.), l'emballage (canettes, barquettes alimentaires), la fabrication d'ustensiles de cuisine, en pharmacie (pansements gastriques, antiacides, adjuvants de vaccins, verre pharmaceutique), chirurgie (céramiques en chirurgie orthopédique et dentaire, alliages dans les implants orthopédiques), en cosmétologie (antiperspirants, produits de maquillage...) ainsi que dans le traitement des eaux d'alimentation (agent flocculant et clarifiant) (IPCS 1997).

### **Aluminium et réglementation**

	Concentrations en aluminium dans les milieux*	Estimation de l'apport journalier en aluminium pour un adulte	Réglementation
<b>Air</b>			
• Urbain	1 000 ng/m <sup>3</sup> (160-7 000)	Pour un débit ventilatoire de 20 m <sup>3</sup> / 24h <b>0,02 mg</b>	Valeur limite de moyenne d'exposition (VME)
• Rural	200 ng/m <sup>3</sup> (150-325)	<b>0,004 mg</b>	
• Milieu professionnel (industrie de l'aluminium)		Pour un débit ventilatoire de 10 m <sup>3</sup> /8h et 8 heures de travail/24h avec 5 mg/ m <sup>3</sup> : <b>50 mg (soit 33 mg/j pour une exposition quotidienne 7j/7 12 mois/12)</b>	5 mg/m <sup>3</sup> (poussières inhalables ) 10 mg/m <sup>3</sup> (poussières totales )
<b>Sols</b>			
• Agricoles	70 000 mg/kg (10 000-300 000)	?	
• Villes	0,0037 à 0,0116 mg/kg	?	
<b>Eaux</b>			
• Pluies	50 µg/L (10-1 200)		
• Eau douce	50 µg/L (1-2 250)		
• Eau de mer	2 µg/L (1-5)		
• Distribution	100 µg/L (< 10-1 000)	Consommation : 2l/j <b>0,2 mg</b>	200 µg/L (valeur guide)
<b>Alimentation</b>	Variable selon aliment	<b>2,5 à 13 mg/j</b>	
<b>Antiacides</b>		<b>840 à 5 000 mg/j</b>	
<b>Antiperspirants</b>	?	?	
<b>Apports totaux</b>			Dose hebdomadaire tolérable (DHTP) :
• Non professionnel		<b>3 à 15 mg/j</b> (sans antiacide)	<b>420 mg/semaine</b> pour un adulte de 60 kg
• Professionnel de l'aluminium		<b>&lt; 50 mg/j</b> (sans antiacide)	

**Tableau 3 : Concentrations environnementales en aluminium et estimation des apports journaliers chez l'homme (tableau constitué à partir des données IPCS 1997)**

Ces résultats montrent que pour la majorité de la population, l'exposition à l'aluminium est essentiellement alimentaire, avec un apport de l'ordre de 2,5 à 13 mg/jour. La quantité d'aluminium apportée par l'eau de distribution représente 0,2 mg soit moins d'un dixième des apports et l'air respiré moins d'un centième. L'eau de distribution est réglementée à 200µg.L<sup>-1</sup>.

Pour les individus travaillant dans l'industrie de l'aluminium et exposés professionnellement, l'apport quotidien en aluminium pourrait être 3 à 10 fois supérieur à celui

d'un non professionnel, si l'on considère la valeur limite de moyenne d'exposition (VME) de 5 mg/m<sup>3</sup> établie pour les fumées et poussières inhalées.

#### Effet de l'aluminium

Grâce à l'efficacité des barrières cutanée, respiratoire et gastro-intestinale, la rétention de l'aluminium par le corps humain est minimale. Cependant, l'absorption respiratoire et gastro-intestinale de petites quantités d'aluminium peut se produire.

Jusqu'à présent, on croyait qu'aucune trace d'aluminium n'était absorbée à partir de l'appareil digestif et que l'administration orale de produits pharmaceutiques contenant des quantités massives d'aluminium était inoffensive. Cependant, plusieurs études ont démontré qu'une petite mais non négligeable fraction d'hydroxyde d'aluminium prise oralement était absorbée (Gorsky et al. 1979; Greger & Baier 1983). Cette fraction devient importante si la quantité totale d'aluminium prise oralement est grande, si la fraction absorbée est augmentée et/ou si l'excrétion de l'aluminium est diminuée.

#### Aluminium et insuffisance rénale

La quantité totale d'hydroxyde d'aluminium administré oralement peut être grande (au dessus de 10 g /jour) chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique sévère (dialysés ou non dialysés), qui souvent prennent de l'hydroxyde d'aluminium comme ligand des phosphates en vue de réduire les taux de phosphates plasmatiques.

Alfrey et ses collaborateurs ont montré que l'aluminium était la source de l'encéphalopathie des dialysés (A. C. Alfrey, Mishell, et al. 1972; A. C. Alfrey, LeGendre, et al. 1976). Ils ont aussi montré que les personnes atteintes d'une démence dialysaire présentaient des niveaux d'aluminium très élevés ainsi que des concentrations accrues dans de nombreux tissus, dont le cortex cérébral (A. C. Alfrey, LeGendre, et al. 1976; A. Alfrey et al. 1980).

Le type de composé d'aluminium peut aussi influencer l'absorption. Par exemple des études réalisées sur les rats ont montré que le citrate de sodium ainsi que le citrate de calcium pouvaient accroître cent fois l'absorption gastro-intestinale d'aluminium. Chez les sujets urémiques, il a été observé un risque d'encéphalopathie induit par l'aluminium quand l'hydroxyde d'aluminium est administré en association avec du citrate de sodium (Bakir et al. 1986) ou du citrate de calcium (Flendrig et al. 1976).

Chez les sujets ne présentant pas une exposition excessive à l'aluminium et ayant une



fonction rénale normale, la charge totale du corps en aluminium a été estimée aux environs de 30 mg (A. Alfrey et al. 1980).

Chez ces sujets, les taux les plus élevés d'aluminium sont trouvés dans les poumons (5-35 µg d'aluminium/g de tissu frais), suivi par les os (1-12 µg/g) et les muscles squelettiques (1-4 µg/g). Le taux d'aluminium sanguin est inférieur à 2 µg/l (Ibnlkhayat Idrissi 2002).

#### Aluminium et maladies neurodégénératives

L'aluminium n'intervient dans aucune fonction biologique, biochimique ou métabolique connue. Pendant longtemps l'aluminium était considéré comme anodin pour l'Homme. Cependant quelques années plus tard il a été démontré que l'aluminium désorganisait une large variété de processus neurologiques (Ganrot 1986) et qu'il représentait un danger potentiel pour le système nerveux (Feldman 1982).

De nos jours l'aluminium est connu pour être un puissant neurotoxique aussi bien chez les animaux que chez l'homme.

C'est en 1973, que fût publié le premier rapport concernant des concentrations élevées d'aluminium dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Depuis de nombreux travaux ont mis l'accent sur l'implication de l'aluminium dans la maladie (Polizzi et al. 2002). Les caractéristiques sont la dégénérescence neurofibrillaire et la présence de plaques séniles dans le cerveau (McLachlan et al. 1991). L'aluminium pourrait être impliqué dans le déclenchement d'événements menant à la formation de plaques du à la présence d'aluminium dans les noyaux des plaques (Edwardson et al. 1986).

### **I.3. Objectif de l'étude**

L'objectif de ce travail est de caractériser puis interpréter la toxicité *in vitro* de particules industrielles ultrafines et de particules élaborées par synthèse hydrothermale.

Dans le cadre de notre démarche expérimentale, nous allons dans un premier caractériser d'un point de vue physico-chimie l'ensemble des particules. Nous réaliserons ainsi cette étude sur six poudres industrielles et huit poudres élaborées par synthèse hydrothermale. Afin d'observer l'influence de la taille des particules sur la toxicité, certaines d'entre elles subiront un traitement (élutriation, broyage, dispersion par sonication) et seront ainsi comparées aux résultats obtenus pour les particules brutes.

Nous procéderons ensuite à l'évaluation globale de leur activité biologique par le biais de tests *in vitro* sur un modèle de macrophage choisi comme étant la première barrière de défense lors de l'inhalation. Nous travaillerons avec la lignée RAW 264.7.

L'évaluation biologique *in vitro* sera ensuite réalisée sur un modèle biologique de macrophages selon une approche multi paramétrique basé sur trois paramètres : l'état d'inflammation, la mort cellulaire et le stress oxydant qui nous permettra d'avoir une idée de la toxicité globale.

La mise en relation des paramètres physico-chimiques et de l'activité biologique permettra d'établir des corrélations. L'objectif étant d'observer le comportement des cellules vis à vis des différentes particules et de donner ainsi une tendance générale de l'activité biologique et des paramètres physico-chimiques impliqués dans la réponse cellulaire.

Les interactions pouvant s'établir entre ces cellules et les nanoparticules de boehmite dans des conditions expérimentales spécifiques seront mesurées. Cette étude permettra de mettre en évidence la corrélation entre le niveau de toxicité induit par les nanoparticules (réaction inflammatoire, stress oxydant, mort cellulaire, génotoxicité) et leurs caractéristiques physico-chimiques (taille, agglomération, chimie de surface...).





# Chapitre II. MATÉRIELS ET MÉTHODES



# SOMMAIRE

Chapitre II. Matériels et méthodes _____	99
<b>II.1. Caractérisation physico chimique des nanoparticules _____</b>	<b>103</b>
II.1.1. Présentation des poudres étudiées _____	103
II.1.2. Techniques analytiques _____	103
<b>II.2. Modèle biologique et tests de cyto-génotoxicité _____</b>	<b>121</b>
II.2.1. Culture <i>in vitro</i> de macrophages de souris _____	121
II.2.2. Techniques d'évaluation de l'activité biologique _____	125
II.2.3. Toxicologie génétique _____	132





## **II.1. Caractérisation physico chimique des nanoparticules**

### **II.1.1. Présentation des poudres étudiées**

#### **II.1.1.1. Les poudres de boehmite**

Les nanoparticules étudiées sont des poudres de boehmite produites industriellement ou par synthèse hydrothermale.

##### ***II.1.1.1.1. Particules industrielles***

Six poudres industrielles appelées Disperal, CAM 9010, CAM 9015, CAM 9060, V250 et Bulky seront étudiées. Les particules de Disperal dont les particules les plus fines sont sélectionnées par élutriation grâce à un impacteur en cascade sont appelées Disperal « dustiness ». Les particules de bulky sont broyées afin d'éliminer les plus grosses particules, son nom est alors bulky broyée.

##### ***II.1.1.1.2. Particules obtenues par synthèse hydrothermale***

Huit poudres élaborées par synthèse hydrothermale sont étudiées. Elles sont notées de 1 à 8. Différentes conditions d'expériences (pH, température...) permettent d'obtenir des poudres présentant des caractéristiques différentes notamment au niveau de leurs cristallisations.

#### **II.1.1.2. Les poudres témoins**

Pour les tests *in vitro* nous avons besoin d'utiliser un témoin positif de toxicité qui correspond à un échantillon connu pour sa toxicité et son caractère cancérigène, le quartz DQ12 (Fubini et al. 2004 ; Bruch et al. 2004).

### **II.1.2. Techniques analytiques**

Afin de caractériser ces différentes poudres plusieurs techniques ont été utilisées et seront détaillées dans cette partie.

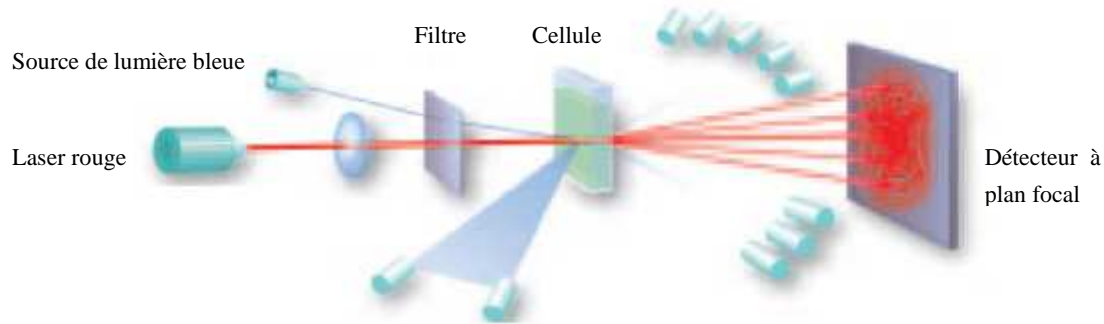
#### **II.1.2.1. Granulométrie par diffraction laser**

La granulométrie laser est une technique de mesure couramment utilisée pour déterminer la distribution en taille de particules. Cette technique est basée sur la diffraction et la diffusion

d'un faisceau laser traversé par un flux de particules. L'angle et l'intensité du rayonnement diffracté sont fonction du diamètre des particules.

Ainsi, l'analyse de la figure de diffraction sur un échantillon représentatif du lot de particules permet de déterminer leur distribution en taille

La Figure 42 montre le principe d'un granulomètre laser.



**Figure 42: Principe de la granulométrie laser (reproduction technique de l'ingénieur)**

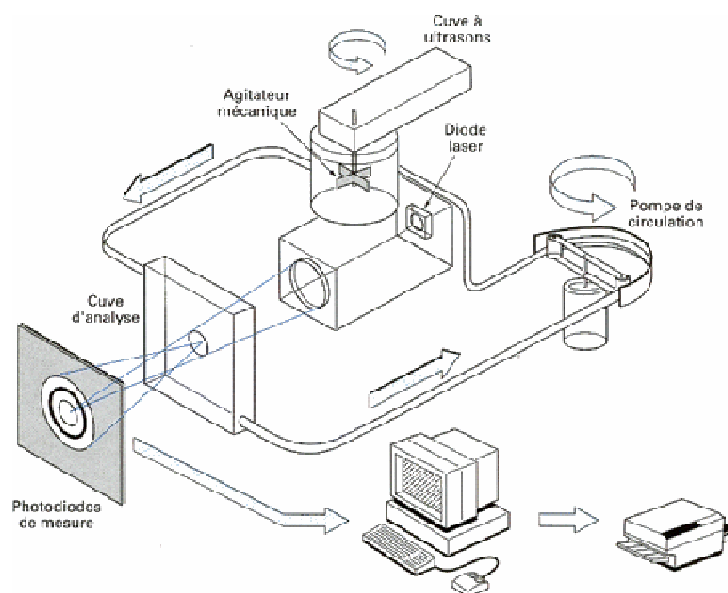
Les mesures ont été effectuées à l'aide de l'appareil Malvern Mastersizer 2000 présent à l'Ecole des Mines de Saint Etienne. Les mesures peuvent être réalisées en voie sèche ou en voie humide.

La gamme de mesure s'étend de  $0,02\mu\text{m}$  à  $2000\mu\text{m}$  en voie liquide et de  $0,2\mu\text{m}$  à  $2000\mu\text{m}$  en voie sèche.

Un granulomètre laser est généralement constitué de cinq sous-ensembles (Figure 44) :

- un système de dispersion de la poudre
- un système de mise en circulation de la poudre
- un ensemble électronique d'amplification des signaux de mesure
- un banc optique
- un micro-ordinateur

Le produit à étudier est préalablement dispersé dans un milieu liquide grâce aux ultrasons ou mis en suspension dans un courant d'air. Celui-ci va circuler à travers une cellule de verre à faces parallèles éclairée par un faisceau de lumière laser (633 et 466 nm). En voie liquide, le liquide porteur doit être transparent à la longueur d'onde utilisée, neutre chimiquement, et présenter un indice de réfraction différent de celui de la particule. Il peut contenir un dispersant mais ne doit pas dissoudre les particules. Dans le cas des poudres nanométriques, il est nécessaire d'utiliser les ultrasons afin d'éliminer la présence d'agglomérats.



**Figure 43: Principe de mesure d'un granulomètre laser (reproduction technique de l'ingénieur)**

Pour la voie liquide, la circulation est opérée en circuit fermé; l'échantillon de poudre passant plusieurs fois dans la zone de mesure. Il est véhiculé par une pompe qui délivre un débit parfaitement stabilisé permettant l'obtention d'un écoulement laminaire dans la zone d'exposition au laser.

Pour la voie sèche, la poudre est transportée dans la veine d'air qui a servi à sa dispersion. L'échantillon ne passe qu'une seule fois devant la zone de mesure, pour être récupéré par un aspirateur. L'écoulement doit être continu, de débit constant, sans turbulence, afin de ne pas créer de ségrégation durant le temps de vol des particules. Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé les différentes mesures en voie liquide car celle-ci ne nécessite que peu de poudre.

#### **Préparation des échantillons**

Une petite quantité de poudre (0,1g) est introduite dans le granulomètre en voie humide, en utilisant l'eau comme solvant. Après une première mesure les ultrasons d'une puissance de 26W sont appliqués à l'échantillon pendant 2 minutes avant de réaliser une nouvelle mesure.

#### **II.1.2.2. Microscopie électronique à balayage**

Les particules de boehmite industrielles ou de synthèse seront observées au microscope électronique à balayage équipé d'un canon à émission de champ (MEB-FEG) afin d'avoir une résolution suffisante pour l'observation des nanoparticules. Ces observations permettront

d'avoir des données sur la morphologie et l'aspect de surface des particules de boehmite. Les particules sont déposées sur un support et après une métallisation à l'or, elles sont observées avec un MEB-FEG (JEOL JSM-6500F) (EMSE).

### II.1.2.3. Granulométrie par diffusion dynamique de la lumière

La spectroscopie par corrélation de photons appartient au groupe des techniques de diffusion dynamique de la lumière. Elle mesure un déplacement lié au mouvement brownien et le relie au diamètre hydrodynamique, ce mouvement est aussi fonction de la charge de surface. C'est une technique capable de mesurer des diamètres de particules en suspension pouvant descendre jusqu'à 3nm. Celle-ci à l'avantage de nécessiter très peu de préparation et un temps de mesure très court, de quelques secondes à quelques minutes.

Lorsqu'une suspension de particules est traversée par un faisceau laser, les particules diffusent une partie de ce faisceau dans toutes les directions. L'intensité du faisceau diffusé fluctue en fonction du temps en raison du mouvement brownien des particules qui a pour conséquence une variation de la position relative des particules. L'appareil détecte les photons et analyse les fluctuations d'intensité en fonction du temps pour donner les coefficients de diffusion des particules. Ces coefficients sont finalement transformés en diamètre hydrodynamique à l'aide de la relation du déplacement brownien de particules sphériques donnée par l'équation de Stokes-Einstein.

#### **Matériel**

Le matériel utilisé est le ZetaSizer nano S (Malvern). Le logiciel relié à l'ordinateur donne directement le pourcentage de particules en intensité mesurée par classe de taille. En considérant que les particules sont sphériques, il calcule ensuite le pourcentage en volume et en nombre.

#### **Préparation des échantillons**

Au préalable des suspensions de boehmite ont été préparées à 100mg/ml. La mesure a été aussi réalisée à différents pH (acide et basique) pour observer l'influence de celui-ci sur l'agglomération des particules dans l'eau.

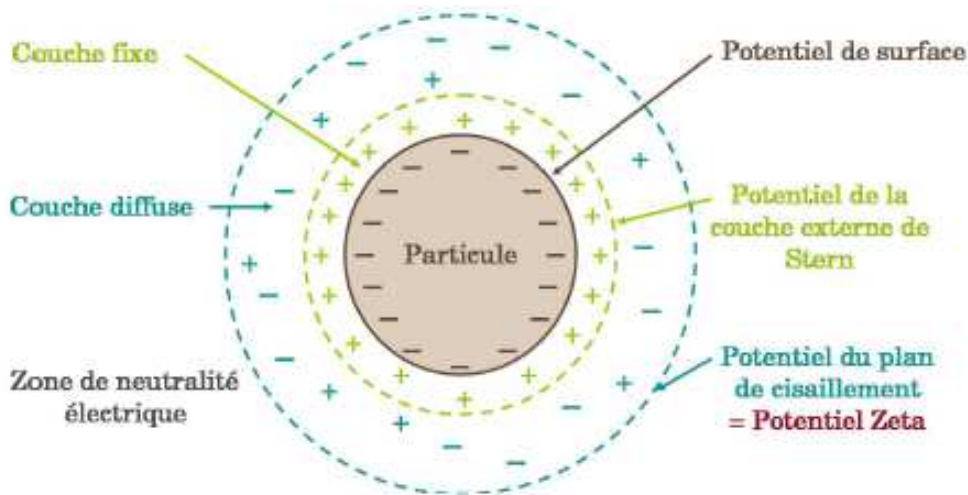
Pour regarder l'état d'agglomération dans les milieux de culture et se placer dans les conditions expérimentales des tests *in vitro*, les particules ont été mises en suspension dans une solution de DMEM (milieu de culture) de façon à obtenir une concentration de 100 mg/ml.

La mesure est ensuite réalisée à différents pH.

#### II.1.2.4. Zétamétrie

La zétamétrie est une technique permettant de mesurer le potentiel zêta de particules en suspension et ainsi de caractériser la stabilité de ces suspensions en fonction de différents paramètres (pH, concentrations en ions...).

Le potentiel zêta  $\zeta$  représente la charge que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en suspension, il est associé à la double couche ionique (Figure 44). Il correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique de la particule en suspension c'est à dire au niveau du plan de cisaillement. Le plan de cisaillement correspond à une sphère imaginaire autour de la particule dans laquelle le solvant bouge avec la particule lorsque les particules se déplacent dans la solution. Le potentiel zêta est défini comme la différence de potentiel existant entre le sein de la solution et ce plan de cisaillement.



**Figure 44: Schéma de la double couche électrique d'une particule, et variation du potentiel électrostatique autour d'une sphère (Simon-deckers 2008)**

En pratique, plus il est élevé en valeur absolue, plus la charge de la particule s'intensifie (négativement lorsque le potentiel zêta est négatif et inversement) ce qui stabilise la suspension en évitant l'agglomération des particules par effet répulsif. A l'inverse, au fur et à mesure qu'il diminue en valeur absolue, les particules deviennent de moins en moins chargées et peuvent donc s'approcher les unes des autres plus étroitement. Cela augmente l'agglomération et adonc pour conséquence une perte de stabilité de la suspension. Par conséquent, le potentiel zêta est un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité colloïdale. Ainsi, on considère qu'une suspension est stable lorsque son potentiel zêta est supérieur à 30mV en valeur absolue.

En général, une particule est chargée négativement et une couche fixe d'ions positifs l'entoure. En s'éloignant, dans une couche diffuse, le potentiel varie pour atteindre la neutralité dans la masse de la solution.

#### **Paramètres influençant le potentiel zêta**

Le principal paramètre influençant le potentiel zêta est le pH. En effet lorsque celui-ci est acide les particules tendent à acquérir des charges positives et lorsque celui-ci est basique les particules tendent à acquérir des charges négatives. On définit alors un pH pour lequel la particule a un potentiel zêta nul : le point isoélectrique pI.

Par ailleurs, d'autres paramètres peuvent jouer sur la valeur du potentiel zêta comme la conductivité (concentration d'un sel) ou encore l'ajout d'un additif (surfactant ionique, polymère).

Par exemple l'épaisseur de la couche diffuse, qui est directement corrélée à l'intensité du potentiel zêta, est régie principalement par la concentration en électrolyte de la solution et par la valence des ions présents. Ainsi plus la force ionique est élevée plus la couche sera comprimée et moins le potentiel zêta sera élevé en valeur absolue.

#### **Préparation des échantillons**

Au préalable des suspensions de boehmite ont été préparées à 100mg/ml. Les mesures ont été réalisées avec le ZetaSizer nano S (Malvern) couplé à un titrateur permettant ainsi d'ajuster le pH à l'aide solution (NaOH et HCl, 1M).

#### **II.1.2.5. Mesure d'aire spécifique par adsorption de gaz**

L'aire spécifique représente le rapport entre l'aire de la surface totale des particules et la masse de produit. Cette surface est constituée de toute la surface externe de chaque particule ainsi que celle de leurs pores ouverts. Ainsi plus les particules seront petites et poreuses, plus leur surface spécifique sera élevée.

Cette méthode de mesure de l'aire spécifique par adsorption de gaz est basée sur la théorie de l'adsorption de l'azote à basse température développée par trois scientifiques Brunauer, Emmett et Teller (B.E.T) (Brunauer et al. 1938). Elle permet de calculer à partir du volume de gaz adsorbé et au moyen de l'équation B.E.T, le volume d'azote adsorbé en monocouche sur la surface du solide. L'aire de cette monocouche correspondant à la surface du matériau est alors déduite sur la base de l'aire d'une molécule d'azote par la formule suivante :

$$S = \frac{N_A \times V_{\text{monocouche}} \times A_{\text{azote}}}{V_M}$$

**Équation II-1**

Avec  $S$  l'aire de la surface totale de l'échantillon en  $\text{m}^2$ ,  $N_A$  le nombre d'Avogadro,  $V_{\text{monocouche}}$  le volume de la monocouche adsorbée en  $\text{m}^3$  déterminé à partir de l'isotherme d'adsorption de BET,  $A_{\text{azote}}$  l'aire d'encombrement de l'azote en  $\text{m}^2$  et  $V_M$  le volume molaire en  $\text{m}^3$ .

L'aire de la surface calculée  $S$  en  $\text{m}^2$  et la masse de l'échantillon  $m$  en g permettent ensuite de calculer l'aire de la surface spécifique de l'échantillon en  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  par la formule suivante :

$$S_{\text{spé}} = \frac{S}{m}$$

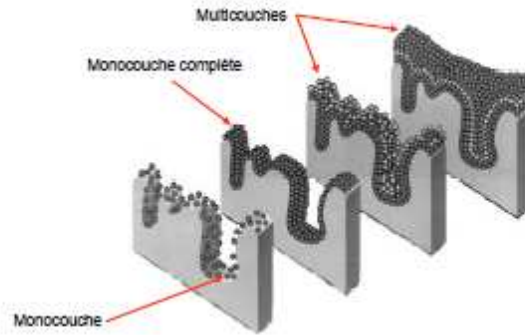
**Équation II-2**

En pratique, l'échantillon est dans un premier temps dégazé sous vide à une température appropriée (en prenant soin de respecter les propriétés physiques de l'échantillon) dans le but d'évacuer les molécules d'eau ou de  $\text{CO}_2$  qui sont adsorbées sur l'échantillon. Dans un second temps il est refroidi dans l'azote liquide, puis de l'azote gazeux est injecté et se fixe à la surface de l'échantillon. Enfin l'échantillon est réchauffé pour libérer l'azote adsorbé qui est alors mesuré. L'appareil en déduit le volume adsorbé en monocouche selon la théorie de BET et ainsi la surface spécifique de l'échantillon (Figure 45).

Si l'on suppose que les particules primaires sont des sphères non poreuses, il est possible d'obtenir la taille des particules primaires à partir des valeurs d'aire spécifique obtenue par la méthode BET et de la masse volumique :

$$d_{pp} = \frac{6}{\rho_{pp} * S_{BET}}$$

**Équation II-3**



**Figure 45: Principe des différentes étapes d'adsorption d'un gaz à la surface d'un solide(Bouhmadi 2009)**

#### Préparation des échantillons

L'appareil utilisé est le Micrométrics ASAP 2000, l'échantillon est pesé puis dégazé pendant 2heures à 150°C.

#### II.1.2.6. Diffraction des Rayons X

La diffractométrie des rayons X est une technique d'analyse basée sur la diffraction des rayons X par les réseaux cristallins. Cette technique va permettre de caractériser les phases minérales micro et poly-cristallines des matériaux.

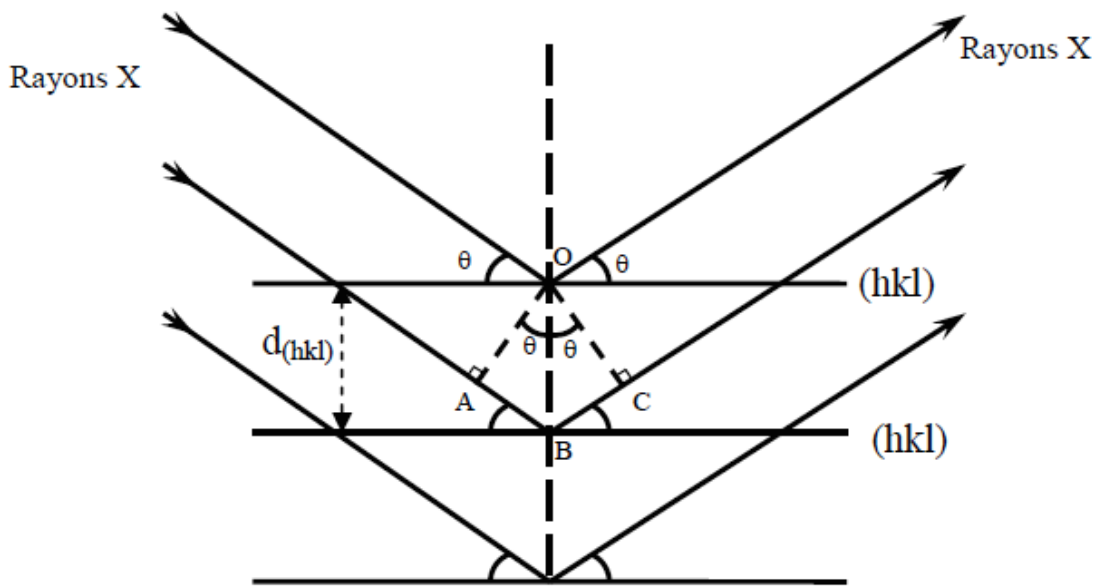
La méthode consiste à envoyer des rayons X sur l'échantillon et un détecteur permet de mesurer l'intensité de ces rayons X selon l'orientation dans l'espace. L'intensité détectée est enregistrée en fonction de l'angle de déviation  $2\theta$ .

Les solides cristallisés ont la propriété de diffracter les rayons X selon des angles  $\theta$  qui dépendent de la distance ( $d_{hkl}$ ) entre deux plans réticulaires du réseau cristallin (Figure 46) (c'est-à-dire entre deux plans de densité atomique) et de la longueur d'onde  $\lambda$  du rayonnement X utilisé. Un diffractogramme est la mesure de l'intensité de la diffraction des rayons X en fonction de l'angle d'incidence  $\theta$  lié à la distance entre les plans inter-réticulaires par la formule de Bragg:

$$2 \cdot d_{(h,k,l)} \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$$

**Équation II-4**





*Figure 46: Schéma de diffraction de rayons X par une famille de plan (hkl),  $\theta$  angle de Bragg (Helfen 2004)*

Donc, si nous connaissons la longueur d'onde du faisceau de rayons X, nous pouvons, à partir de la mesure de l'angle  $\theta$ , déterminer les distances inter réticulaires  $d_{(hkl)}$  caractéristiques du matériau, plus les raies de diffraction sont fines, plus le réseau cristallin est organisé à grande échelle. Puis, nous pouvons alors identifier les phases et les structures cristallines de l'échantillon, en comparant avec des bases de données.

**Protocole expérimental:** le diffractomètre utilisé est un diffractomètre D5000 de Siemens. Le détecteur multicanal est constitué d'une série de 4096 canaux répartis sur un arc de  $120^\circ$  centré sur l'échantillon. Un prélèvement de quelques dizaines de milligrammes est suffisant pour une mesure de diffraction des rayons X.

L'acquisition se fait simultanément pour tous les angles  $2\theta$  de diffraction, la source de rayons X restant immobile. La source utilisée est une anticathode de cuivre caractérisée par sa raie  $K\alpha$  ( $\lambda = 1,5403\text{\AA}$ ), obtenue sous une tension de 40 kV et un courant de 20 mA appliqué sur une anticathode de cuivre, raie isolée par un monochromateur et concentrée par un collimateur.

Les échantillons sont préparés en poudre répartie sur lame de verre fixée au centre de l'arc. Le faisceau de rayons X frappe la poudre avec un angle d'incidence faible et les rayons diffractés sont mesurés simultanément sur les  $120^\circ$  d'arc.

### II.1.2.7. Spectrométrie d'émission atomique

L'ICP-AES (Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif) permet de doser des espèces chimiques à des faibles quantités dans un échantillon, donc ainsi de déterminer les impuretés présentes.

L'appareillage est composé (Figures 47 et 48):

- d'une source de nébulisation / atomisation / excitation de l'échantillon; elle comprend générateur H.F., torche et nébuliseur
- d'un dispositif dispersif (monochromateur et/ ou polychromateur) pour analyser le rayonnement émis par l'échantillon;
- d'un ensemble électronique / informatique pour la gestion des spectromètres et l'exploitation des données.

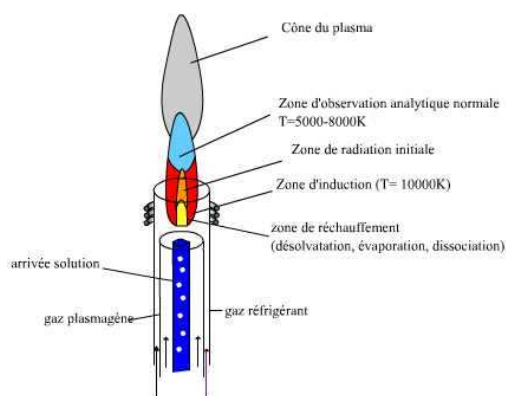


Figure 47: Différentes zones dans la torche à Plasma (Extrait de <https://moodle.insa-rouen.fr/>)

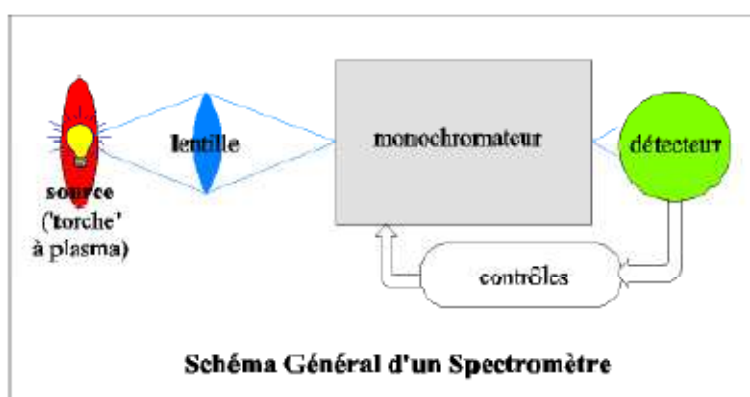


Figure 48: Schéma d'un appareillage d'analyse par émission (Extrait de [www.emse.fr/](http://www.emse.fr/))

L'échantillon liquide est alors prélevé, nébulisé puis transmis vers le plasma. Il subit les différentes étapes de décomposition, d'atomisation, d'ionisation : les atomes et ions émis sont

alors excités. L'intensité des raies émises par ces espèces, lors de leur retour vers leurs niveaux d'énergie fondamentaux, est ensuite mesurée.

Le plasma est un gaz (argon) partiellement ionisé et macroscopiquement neutre. La haute température (6000-10000°C) générée permet d'éliminer les interférences chimiques, et rend accessible à la fois les raies ioniques et atomiques. L'acquisition de tels spectres nécessite une haute précision. L'appareil qui a été utilisé pour la mesure des concentrations des différents éléments est un Jobin-Yvon JY138 Ultrace.

#### Préparation des échantillons

L'échantillon à analyser est tout d'abord pesé (environ 250mg). Ensuite est ajouté 1mL d'acide nitrique et 3mL d'acide chlorhydrique. Le mélange est ensuite agité et chauffé pendant une heure à 60°C.

#### II.1.2.8. Spectroscopie de photoélectrons X

La spectroscopie XPS (Spectroscopie de photoélectrons X) est une technique d'analyse de surface, elle permet de déterminer l'état chimique des surfaces après les différents traitements chimiques. Le principe général de cette technique d'analyse utilise l'effet photoélectrique résultant du bombardement d'un échantillon par un flux de photons X (Figure 49). Elle fournit des informations sur la composition et l'état électronique de la surface d'un échantillon. Elle est en effet basée sur l'analyse de l'énergie cinétique  $E_c$  des photoélectrons émis par un échantillon, sous l'effet de l'irradiation par un faisceau monochromatique de photons X. Tout électron des niveaux de cœur ou de valence dont l'énergie de liaison ( $E_l$ ) est inférieure à l'énergie excitatrice  $h\nu$  peut être extrait. Le spectre en énergie de liaison des électrons de cœur obtenu lors de l'analyse permet d'identifier les atomes présents au voisinage de la surface. La sensibilité de cette méthode pour les analyses de surface découle des faibles valeurs du libre parcours moyen élastique des photoélectrons. L'énergie  $E_c$  de l'électron photoémis est analysée pour déterminer l'énergie de liaison  $E_l$  de l'électron dans son état de départ :

$$E_c = h\nu - E_l$$

*Équation II-5*

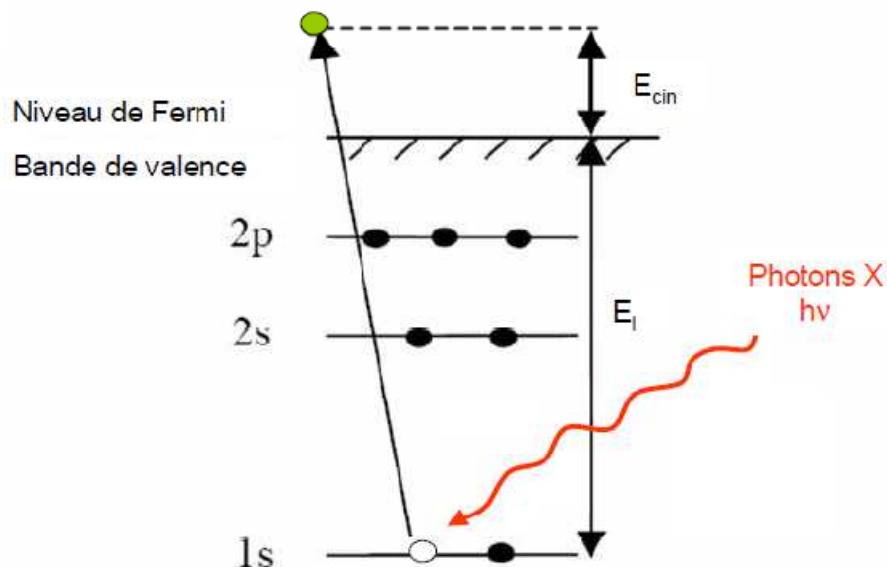


Figure 49: Principe de la photoémission (Ekoue 2002)

#### Déplacement chimique en XPS :

Chaque atome possède un spectre des énergies de liaison des électrons spécifique ce qui permet d'avoir une indication sur la nature chimique et sur le dosage du composé étudié.

Lors de la formation d'une liaison chimique, et du fait de transferts d'électrons de valence entre atomes échangeant une liaison, les états électroniques de cœur subissent une modification de leur niveau d'énergie. Ces perturbations de l'énergie de liaison des niveaux de cœur en fonction de l'environnement chimique de l'atome, appelées déplacement chimique, permettent d'identifier les différents constituants de la liaison chimique. En première approximation, il est possible d'expliquer simplement l'origine de ces déplacements chimiques. Lorsque deux atomes forment une liaison, l'atome le plus électronégatif attire la charge électronique. Sa charge partielle de valence devient négative, induisant une augmentation des forces de répulsion entre les électrons de valence et ceux des niveaux de cœur. Pour cet atome, les énergies de liaison des électrons de cœur diminuent. Le phénomène inverse est attendu pour l'atome le moins électronégatif.

#### Profondeur analysée par XPS :

Lors de son transfert vers la surface à travers le solide, un photoélectron subit un certain nombre d'interactions inélastiques se traduisant par l'existence d'un libre parcours moyen élastique  $\lambda$ . Ce paramètre gouverne la profondeur d'analyse en XPS. Il dépend principalement de l'énergie cinétique des électrons, donc de l'énergie incidente  $h\nu$  du photon X, et dans une moindre mesure de la nature du matériau. Le libre parcours moyen élastique est donné

grossièrement par la formule  $\lambda = 0,4 \sqrt{E_c}$  ( $\lambda$  en Å,  $E_c$  en eV) pour  $E_c > 100\text{eV}$ , de l'ordre de quelques dizaines de nm.

#### Protocole expérimental :

Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre Thermo VG Thetaprobe au centre des Sciences des Matériaux et des Structures (SMS) de l'école des Mines de Saint Etienne. Une source X AlK $\alpha$  monochromatique focalisée est utilisée afin d'obtenir une zone d'analyse de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre, à une pression de résiduelle de  $10^{-10}$  Torr. Les spectres ont été acquis grâce à un analyseur hémisphérique en mode d'analyse à énergie constante avec une énergie de passage ( $E_p$ ) de 300 eV pour les spectres larges et de 50 eV pour les fenêtres énergétiques effectuées sur les pics Si2p, Si2s, C1s et O1s. La résolution énergétique mesurée sur un échantillon d'argent pur correspond à une largeur à mi-hauteur de Ag3d5/2 de 1eV pour  $E_p = 300$  eV et 0,55 eV pour  $E_p = 50$  eV. La quantification, compte tenu des approximations effectuées (libre parcours moyen, fonction de transmission, répartition homogène des éléments sur la profondeur d'analyse) est donnée avec une précision de l'ordre de 20%.

#### II.1.2.9. Diamètre aérodynamique par impacteur en cascade

L'Impacteur en cascade Electrique à Basse Pression, ELPIde DEKATI (Keskinen et al. 1992)(Marjamäki et al. 2000), est un instrument de mesure permettant de déterminer en temps réel la distribution de taille d'un aérosol dans une gamme comprise entre 27 nm et 10  $\mu\text{m}$ . Il est composé de trois éléments: un chargeur corona, un impacteur en cascade à basse pression muni de 12 électromètres, et une pompe à vide qui sert à prélever l'aérosol avec un débit constant de 10 L/min.

##### II.1.2.9.1. *Le chargeur corona*

Le chargeur corona (Marjamäki et coll., 2000) est constitué d'une électrode fine de 5 mm de largeur en forme d'aiguille, centrée sur une deuxième électrode cylindrique externe (Figure 50). La différence de potentiel entre les deux électrodes (5kV) génère une décharge dans la pointe de l'électrode interne qui va produire des ions positifs. Ces ions vont se déplacer en direction de l'électrode externe. Les particules se chargent en traversant l'espace entre les deux électrodes, suite à des collisions qui peuvent être dues au mouvement d'ensemble des ions à travers le champ électrique ou au mouvement brownien des ions.

Le chargeur corona est formé d'une troisième électrode, positionnée à côté de l'électrode en forme d'aiguille, séparé par une pièce isolante en téflon. L'objectif est de retenir les très

petites particules. Les particules de moins de 27nm ont un diamètre aérodynamique inférieur au diamètre de coupure de l'impacteur en cascade, et ne peuvent pas être mesurées

L'ensemble des particules pénétrant dans le chargeur corona est piégé. En effet, certaines particules soumises à une accélération radiale due à l'existence du champ électrique, restent sur les parois du chargeur. On définit la pénétration P des particules d'une taille donnée comme la fraction de celles-ci sortant du chargeur par rapport à celles qui y rentrent (Ibaseta 2007).

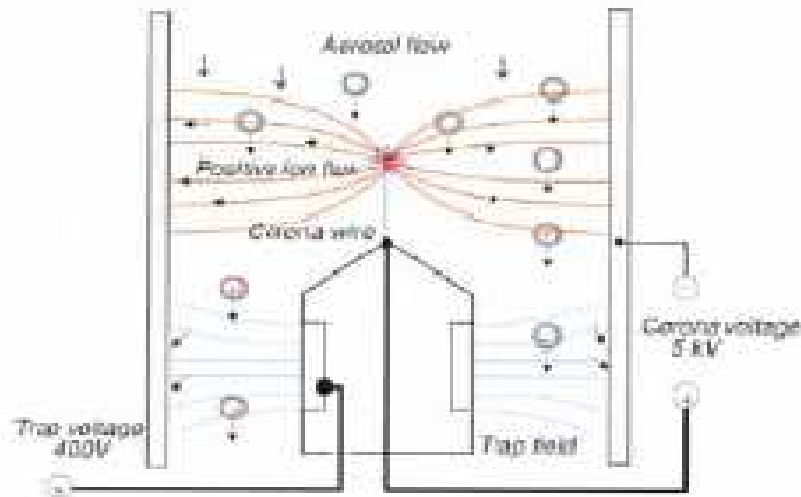


Figure 50: Schéma d'un chargeur corona (Dekati 2003)

#### II.1.2.9.2. Impacteur en cascade

L'impacteur en cascade de l'ELPI est constitué de 13 étages connectés à un électromètre qui mesure le courant généré lorsque les particules chargées impactent contre le plateau de collecte (Figure 51). Seul le premier plateau n'est pas connecté. Les différents étages sont isolés électriquement par des pièces en téflon placées entre deux étages successifs. Les paramètres d'étalonnage mesurés par le fabricant pour chaque étage sont le diamètre de coupure, la pression de stagnation et le temps de séjour. Les données correspondantes à l'ELPI de l'EMSE sont dans le Tableau 4. Il faut noter que les étages de l'ELPI sont numérotés à l'envers par rapport aux impacteurs en cascades usuels: le premier étage est le dernier à être traversé par l'aérosol.

Le diamètre aérodynamique,  $d_a$ , de la particule est le paramètre déterminant le dépôt de celle-ci sur tel ou tel étage de l'ELPI. Lorsque  $d_a$  est inférieur au diamètre de coupure de l'étage, la particule peut continuer son parcours vers l'étage suivant; dans le cas contraire, elle impacte contre le plateau de collecte (Ibaseta 2007).

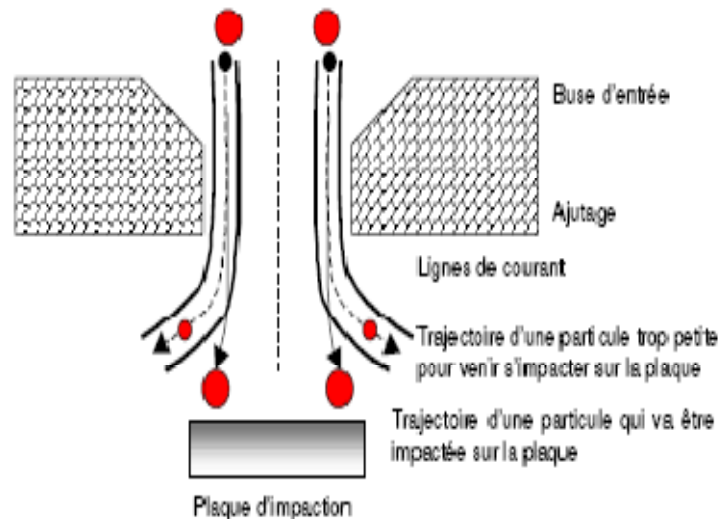


Figure 51: Principe de fonctionnement de la séparation des particules (Dekati 2003)

Etage	Diamètre de coupure ( $\mu\text{m}$ )	Pression de stagnation en aval (kPa)	Temps de séjour (s)
1	0.0271	10.00	0.0170
2	0.0542	21.74	0.0299
3	0.0927	39.08	0.0530
4	0.153	68.38	0.0693
5	0.258	88.94	0.0757
6	0.376	97.03	0.0776
7	0.605	99.58	0.0782
8	0.936	100.47	0.1000
9	1.68	100.99	0.1000
10	2.36	101.17	0.1000
11	3.95	101.24	0.1000
12	6.61	101.30	0.1000
13	9.80	101.32	0.1000
Entrée		101.33	

Tableau 4: Données issues de l'étalonnage de l'impacteur en cascade de l'EMSE (Dekati 2003)

### II.1.2.9.3. Electromètres

Chaque étage de l'impacteur comprend un électromètre, il y a donc 12 électromètres au total qui permettent de mesurer le courant généré par les particules lorsqu'elles impactent contre les étages de l'ELPI. Le 13<sup>ème</sup> étage ne comprend pas d'électromètre car celui-ci sert

juste à empêcher l'accès aux particules ayant un diamètre aérodynamique supérieur à la gamme de mesure c'est-à-dire supérieur à 9,8 µm (Ibaseta 2007).

### II.1.2.10. Résonance Paramagnétique Electronique

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique permettant de quantifier la capacité des poudres de boehmite à générer des radicaux libres tels que HO• et COO•. Ces derniers ont une durée de vie très courte. Afin de doser ces radicaux libres, il convient de les piéger (spin-trapping) dans des espèces paramagnétiques plus stables que l'on quantifie ensuite par RPE.

Cette technique permet d'observer l'absorption d'énergie par un système (ici, des électrons) immergé dans un champ magnétique homogène. En effet, l'électron possède un spin et un moment magnétique. En présence d'un champ magnétique extérieur, les deux orientations permises du spin ( $\alpha$  et  $\beta$ ) déterminent deux niveaux d'énergie (Figure 52).

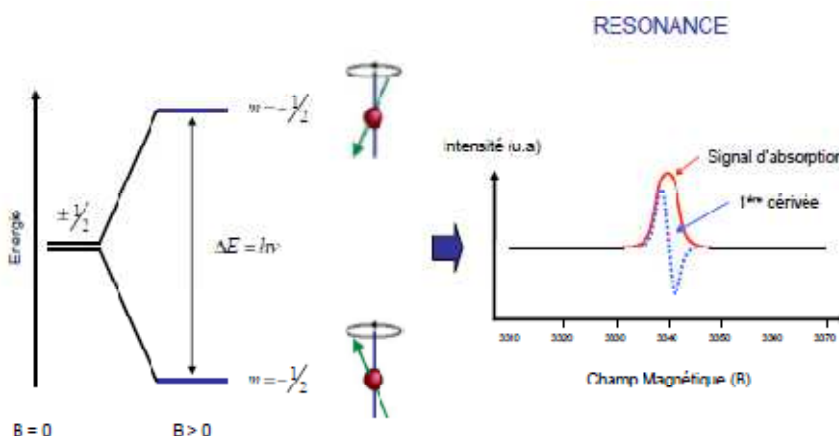


Figure 52: Principe de la mesure en RPE (Réglier s. d.)

On peut provoquer le retournement du spin, en appliquant un champ électromagnétique de fréquence appropriée, et détecter l'absorption d'énergie qui résulte de cette transition. Lorsque l'écart entre les deux niveaux d'énergie devient égal à l'énergie des photons ( $h\nu$ ), ceux-ci sont absorbés. C'est la résonance avec pour condition :

$$h\nu = g\beta B_0$$

**Équation II-6**

$h$  = constante de Planck

$\nu$  = fréquence du champ micro-onde

$g$  = facteur de Landé



$\beta$  = magnéton de Bohr

$B_0$  = valeur du champ magnétique à la résonance

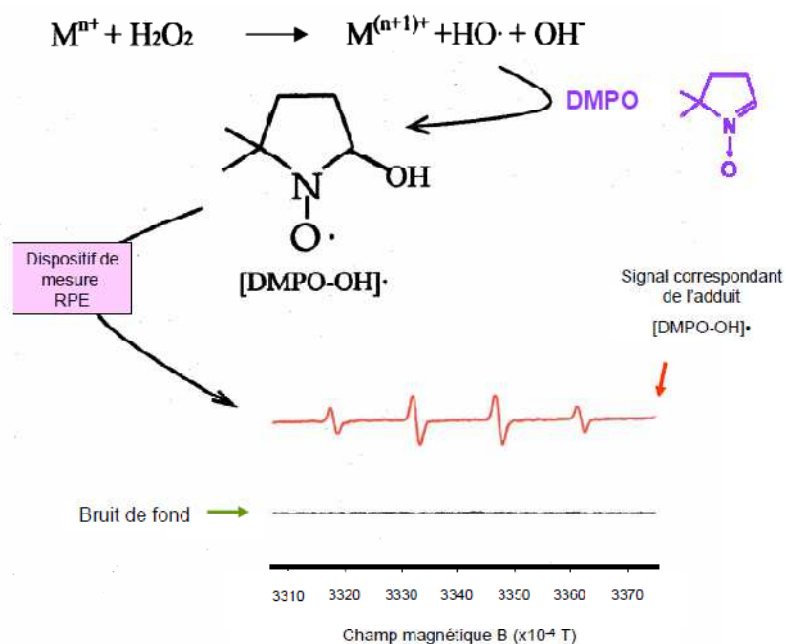
Chaque élément dosé possède un spectre d'absorption caractéristique par sa forme, sa position et son intensité. Ainsi, les signaux obtenus pour les composés étudiés sont parfaitement connus (I. Fenoglio et al. 2003c; I Fenoglio et al. 2006b). L'intensité des raies est proportionnelle à la quantité de radicaux libres générée. Il est possible grâce à l'utilisation d'un étalon de référence (Manganèse) de concentration connue de quantifier ces radicaux libres générés.

Nous avons réalisé indépendamment deux dosages de radicaux libres par piégeages en milieu acellulaire (B Fubini et al. 1995d). Nous cherchons à mettre en évidence la capacité des poudres de boehmite à réagir respectivement avec  $H_2O_2$  et C-H.

- $H_2O_2$  pour former des radicaux  $HO^\bullet$  (Figure 53) :

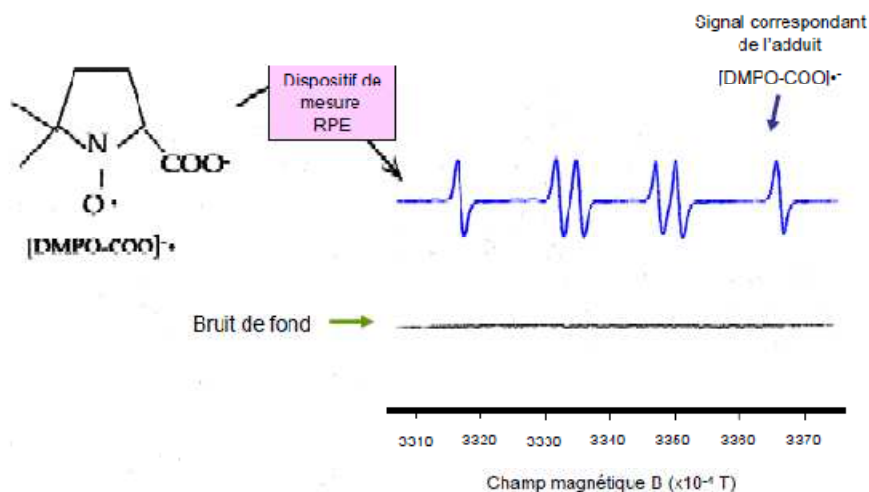
Pour cela une quantité connue de poudre est mise en suspension dans une solution tampon (0,5 M de phosphate de potassium tampon, pH 7,4) avec 0,15 M de DMPO (5-5'-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide). Lors de l'ajout de la molécule cible, le peroxyde d'hydrogène, la réaction démarre. La quantité de radicaux est progressivement mesurée dans des aliquots de 50  $\mu$ l prélevés dans la suspension aux temps 10, 30 et 60 minutes. La présence d'espèces radicalaires dans les suspensions est mesurée par spectroscopie de RPE (Miniscope 100 EPR spectromètre, Magnettech).

L'ensemble de ces analyses a été effectué au département de chimie de l'Université de Turin.



**Figure 53: Principe de génération de radicaux HO• via des réactions impliquant des espèces métalliques (activité de Fenton) avec piégeage dans du DMPO. Observation du signal correspondant à l'adduit [DMPO-OH]• (Boumahdi)**

- des groupements C-H (communs à de nombreuses molécules présentes dans le milieu biologique) pour entraîner la formation du radical correspondant. Nous utiliserons pour cela le formiate de sodium (HCOO<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>) comme agent cible, conduisant après rupture de la liaison C-H, à la formation du radical COO•<sup>-</sup> (Figure 54).



**Figure 54: Principe de génération de radicaux COO•- avec piégeage dans du DMPO. Observation du signal correspondant à l'adduit [DMPO-COO]•- (Boumahdi)**

Dans ce cas, une quantité connue de poudre a été mise en suspension dans une solution tampon (0,5 M de phosphate de potassium tampon, pH 7,4) avec 0,15 M de DMPO (5-5'-diméthyl-1-pyrroline-Noxide). La réaction démarre à l'ajout de la molécule cible formiate de sodium ( $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ). Et la quantité de radicaux est progressivement mesurée de la même façon que précédemment.

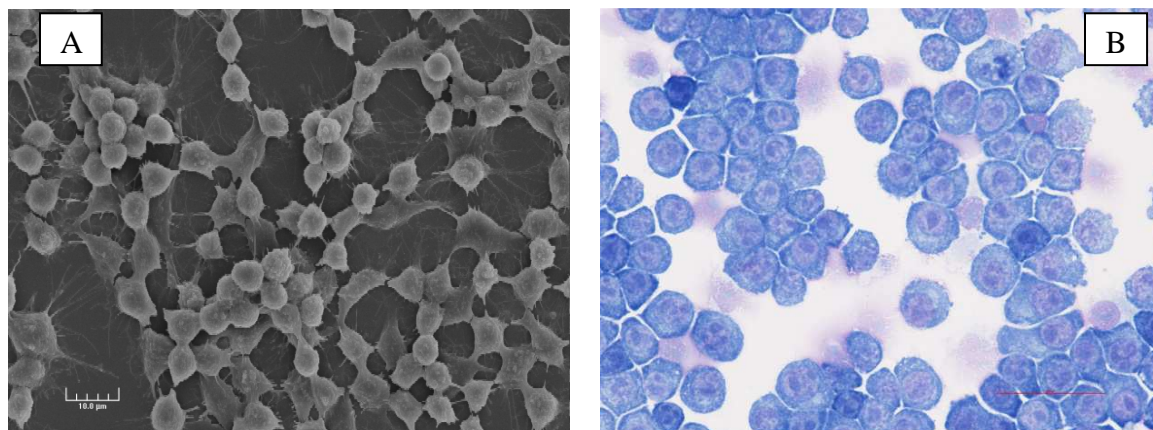
## **II.2. Modèle biologique et tests de cyto-génotoxicité**

Dans le contexte de nos thématiques de recherche portant sur l'appareil respiratoire, lorsque les particules sont inhalées elles pénètrent dans le tractus respiratoire par la trachée jusqu'aux cellules alvéolaires et bronchiques. Les particules pourront alors rencontrer des cellules cibles privilégiées telles que les macrophages. Nous avons donc choisi comme modèle cellulaire une lignée de macrophages de souris. Nous avons conscience que ce modèle est loin d'être parfait puisqu'il s'agit de cellules transformées, mais il permet de disposer de matériel cellulaire en quantité suffisante et reproductible sur plusieurs semaines. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques humaines, ce modèle *in vitro* devrait être complété pour les études futures par des analyses réalisées à partir de macrophages provenant de lavage broncho-alvéolaire.

### **II.2.1. Culture *in vitro* de macrophages de souris**

La culture cellulaire est un outil indispensable pour des études *in vitro* de toxicité. La lignée cellulaire est entretenue de façon à obtenir du matériel cellulaire reproductible et en quantité suffisante, afin de réaliser l'ensemble des tests biologiques lors d'une même expérience d'exposition aux nanoparticules d'intérêt.

La lignée cellulaire RAW 264.7 que nous utilisons pour cette étude (ATCC Cell Biology Collection LGC Promochem), est une lignée de macrophages d'origine péritonéale (MA) de souris transformée par le virus AMLV (Abelson Murine Leukemia Virus) (Figure 55).



**Figure 55: Macrophages (RAW 264.7) observés au microscope électronique à balayage (A) et au microscope optique après coloration MGG (B)**

#### II.2.1.1. Culture cellulaire

Après décongélation des cellules conservées dans l'azote liquide, la lignée est cultivée dans une étuve à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans des boîtes de culture de 25cm<sup>2</sup> ou 75cm<sup>2</sup> contenant respectivement 8mL ou 25mL de milieu de culture. Le milieu de culture (DMEMc) est composé de 10mL de sérum de veau fœtal (FVS 10%) décomplémenté (Gibco), 1 mL de pénicilline/streptomycine (50/50 ; Sigma) dans 100mL de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Gibco).

Les subcultures sont réalisées de la façon suivante :

Lorsque la confluence est atteinte (deux fois par semaine), les cellules adhérentes sont décollées avec un grattoir en plastique stérile (Falcon). Les cellules en suspension sont numérées (2 à 3 millions) puis centrifugées 10min à 432g et le culot est reparti dans de nouvelles boîtes contenant 20 mL de milieu frais. Un nouvel aliquot est décongelé après 15 passages des cellules en culture, afin d'éviter une dérive phénotypique ou lorsque tout changement morphologique suspect apparaît. Les aliquots sont conservés dans l'azote liquide (-196°C) ce qui assure la conservation des cellules.

#### II.2.1.2. Préparation des cellules et des nanoparticules

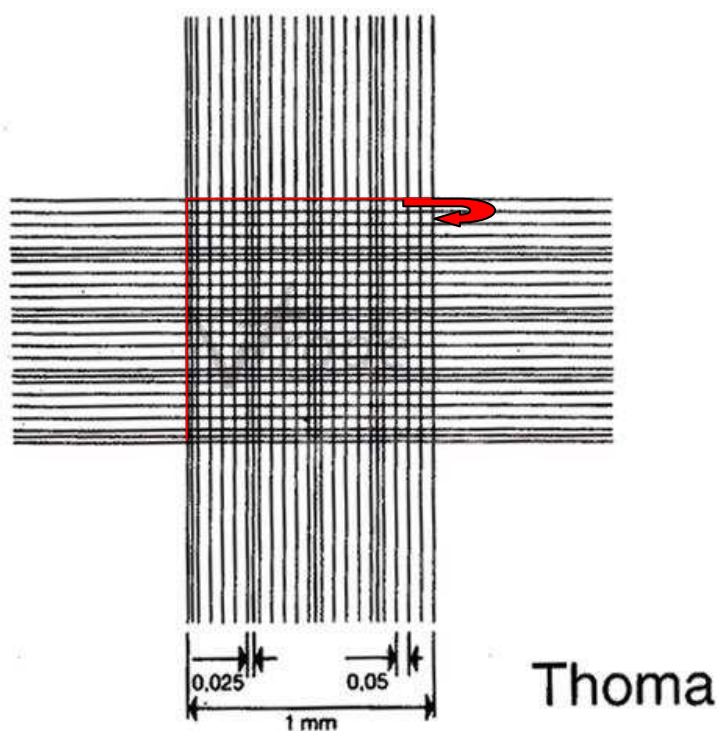
##### II.2.1.2.1. Préparation cellulaire

Les cellules sont décollées de la boîte de culture cellulaire afin d'être comptabilisées.

### Numération cellulaire : test de viabilité au bleu trypan

Le bleu trypan est un colorant qui pénètre dans les cellules présentant une perte d'intégrité membranaire (cellules mortes) alors qu'il est exclu des cellules vivantes. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP (adénosine-5'-triphosphate) peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera le colorant et restera incolore tandis qu'une cellule morte ne pourra le rejeter et apparaîtra bleue. Au microscope optique les cellules vivantes sont donc différenciées des cellules mortes. Il est alors possible de déterminer le taux de mortalité cellulaire en utilisant une cellule de Thoma qui permet de déterminer le nombre de cellules vivantes et mortes.

Pour cela on prélève 80 $\mu$ l de bleu trypan auquel on ajoute 20 $\mu$ l de la suspension cellulaire après décollement de la boîte de culture dans un tube eppendorff. Ce qui représente une dilution au 1/5<sup>ème</sup>.



*Figure 56: Schéma d'une cellule de Thoma*

La cellule de Thoma (Figure 56) va permettre de dénombrer les cellules mortes et vivantes correspondant au principe de numération cellulaire afin de connaître le nombre de cellules dans un échantillon. Une fois le nombre de cellules établi, il est alors possible de déterminer la viabilité cellulaire. Pour cela le quadrillage de la cellule de Thoma va nous permettre de

nous repérer lors du comptage des cellules. On va ainsi compter les cellules se trouvant sur le carré central en le sillonnant par des allers-retours soit 16 carrés subdivisés en 16 petits carreaux chacun. Pour les cellules se trouvant sur les bords on en choisit au préalable deux sur lesquelles les cellules seront comptées et deux autres où elles ne le seront pas. On compte alors les cellules bleues et les cellules blanches présentes dans cette chambre de comptage. Viabilité cellulaire :

$$Viabilité = \frac{\text{nombre de blanches}}{\text{nombre de cellules totales (bleues + blanches)}} * 100$$

*Équation II-7*

Nombre de cellules par mL : Nombre de cellules vivantes comptées x 5 x 10 x 1000 (pour une dilution au 1/5<sup>ème</sup> de la suspension cellulaire dans le bleu trypan).

Nous estimons que la viabilité de la ligne cellulaire doit être supérieure à 90% pour pouvoir réaliser les différents tests cellulaires d'activité biologique.

#### *II.2.1.2.2. Préparation des nanoparticules*

Les particules sont préparées dans le milieu de culture des cellules (DMEMc). Nous préparons des doses de particules d'une concentration de 15, 30, 60 et 120 µg pour 10<sup>6</sup> macrophages, équivalentes à 15, 30, 60 et 120 µg.mL<sup>-1</sup> et à 4,4 ; 8,8 ; 17,6 ; 35,2 µg.cm<sup>-2</sup>. Ces doses ont été choisies d'après la littérature et notamment d'après la méthode de Bruch lors de l'évaluation biologique de différents échantillons de quartz sur laquelle nous nous sommes donc basée (Bruch et al. 2004a). Afin de réaliser ces différentes concentrations on prépare une suspension de particules dans un tube eppendorff complété par du milieu de culture complet. Les suspensions sont ensuite préparées aux concentrations désirées par dilutions successives dans du milieu de culture. Des suspensions fraîches (<1heure) sont utilisés afin d'éviter tout phénomène d'agglomération.

Pour les tests *in vitro*, nous avons besoin de particules témoins, un témoin positif et un témoin négatif de toxicité. Pour ces choix nous nous sommes basées sur la littérature. En effet nous avons utilisé le quartz DQ12 (S<sub>BET</sub>=11m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) connu pour sa toxicité et sa réactivité de surface (B. Fubini & Bruch 2004e; Bruch 2004) comme témoin positif de toxicité. Nous avons choisi de comparer nos résultats avec les cellules seules en absence de contact particulier, sans utiliser de témoin négatif. Il est en effet difficile de choisir un témoin négatif qui sera inerte en milieu biologique pour les différents paramètres étudiés et pas forcément adapté à une comparaison avec la boehmite. Cependant plusieurs travaux ont été réalisés en

utilisant différents témoins négatif de toxicité, le  $\text{CaSO}_4$  (Poser, Q. Rahman, Lohani, et al. 2004; Dopp, Yadav, et al. 2005), le corindon ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (Bruch et al. 2004) et de  $\text{TiO}_2$  (Q. Rahman, Lohani, Dopp, et al. 2002).

Lors des tests *in vitro* les cellules seront incubées en même temps que les nanoparticules.

## **II.2.2. Techniques d'évaluation de l'activité biologique**

Les différents tests de toxicité seront réalisés dans des plaques 96 puits.

### **II.2.2.1. Morphologie cellulaire : coloration MGG**

La coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) est une méthode de coloration usuelle en hématologie et cytologie pour différencier les cellules du sang lors des préparations cellulaires.

Il repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres et sur l'affinité des éléments cellulaires pour les colorants acides ou basiques. Ces deux colorants sont :

- Le May-Grünwald, neutre, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène (sous forme d'éosinate de bleu de méthylène).
- Le Giemsa, neutre, contenant lui aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène (sous forme d'éosinate d'azur de méthylène)

Ces deux colorants sont solubilisés dans l'alcool méthylique et sont de ce fait inactifs : c'est le contact de l'eau qui leur donne un pouvoir colorant. Les sels se dissocient alors en colorant acide (l'éosine) et basique (azur et bleu de méthylène).

- Les éléments cellulaires acides, seront colorés sélectivement par les colorants basiques. Ces éléments sont qualifiés de basophiles (ADN, cytoplasme des lymphocytes)

### **II.2.2.2. Viabilité cellulaire : dosage de la LDH**

La LDH (Lactate Déshydrogénase) est une enzyme présente dans le cytoplasme des cellules vivantes. En cas de lyse de la membrane plasmique (par un agent toxique ou lors d'interactions cellules - particules), la LDH est libérée dans le milieu qui peut être du milieu de culture dans le cas de modèle *in vitro*. Le dosage de la LDH permet de quantifier la cytotoxicité, car c'est un témoin de la mort cellulaire.

La mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture peut être réalisée par dosage enzymatique colorimétrique (Goergen et al. 1993; Moore et al. 1995; Racher et al. 1990).

Ce test consiste ainsi à déterminer la quantité d'enzyme libérée dans le milieu. Pour ce faire nous allons mesurer l'activité de la LDH du milieu après un temps de contact des particules

avec les cellules et ce en comparaison avec un témoin positif de cellules lysées (Solution aqueuse de Triton®-X100 à 9%).

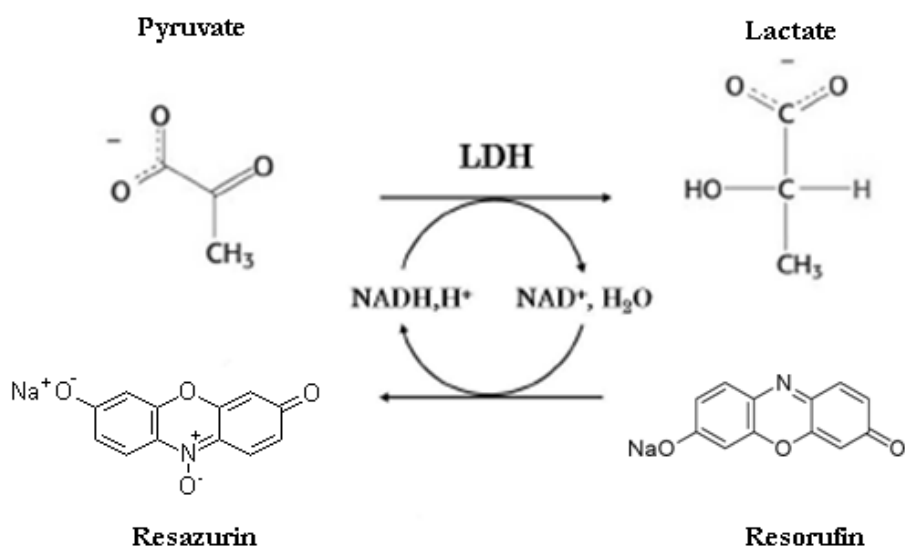
La mesure de l'activité LDH est basée sur le principe suivant (Figure 57):

L'hydrolyse du lactate en pyruvate par la LDH conduit à la formation du composé réducteur :  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .

Ce réducteur est ensuite utilisé comme réactif limitant d'une réaction catalysée par une seconde enzyme : la diaphorase.

Cette enzyme catalyse une réaction colorimétrique, en transformant son substrat (Résozurin) en un fluorescent (Résorufin).

Ainsi d'après les deux réactions mises en jeu l'absorbance mesurée est proportionnelle à l'activité de la LDH du milieu. Les échantillons seront donc analysés à l'aide d'un fluorimètre.



*Figure 57: Principe du dosage de la LDH (Simon-deckers 2008)*

Pour cela les macrophages sont incubés avec les particules de boehmite ( $1.10^5$  macrophages/puits) dans leur milieu biologique à  $37^\circ\text{C}$  sous 5% de  $\text{CO}_2$ . Après 24 heures d'incubation le surnageant est prélevé et testé avec un kit de dosage commercial (Promega). La quantité de LDH libérée est mesurée par fluorométrie et les résultats sont exprimés en pourcentage de LDH libérée comparé aux témoins positifs (quartz DQ12) et négatifs (cellules seules).



### II.2.2.3. Réaction inflammatoire : dosage du TNF- $\alpha$

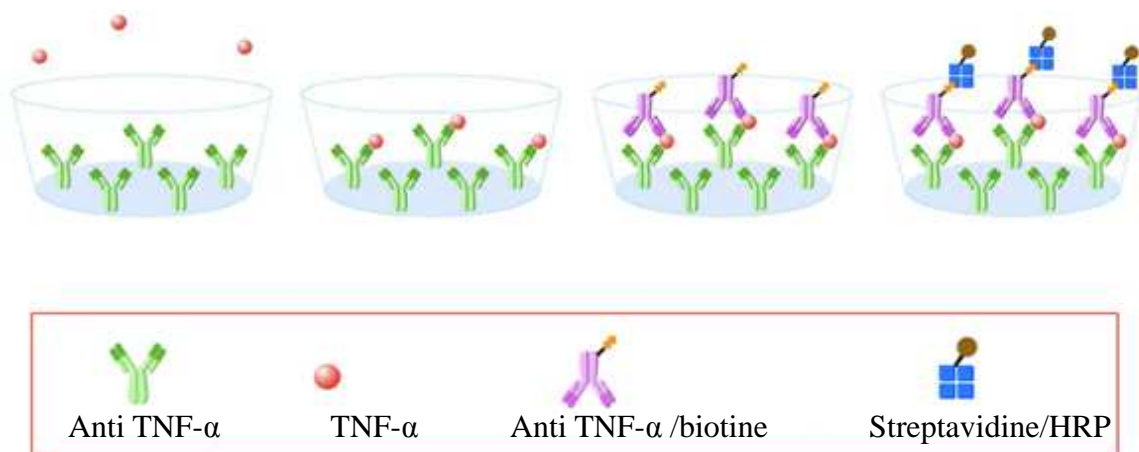
Le TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor) est une cytokine sécrétée par les macrophages. Il joue le rôle de cytokine pro-inflammatoire, mais la réaction inflammatoire à proprement parler est entraînée par la production de plusieurs cytokines en plus du TNF- $\alpha$ .

Les cellules sont incubées 24h avec les particules dans leur milieu biologique. A l'issue de ces 24 heures, les cytokines présentes dans le surnageant sont dosées par un kit ELISA (R&D Systems®). Ce kit utilise une technique d'immunologie quantitative (Figure 58).

Un anticorps polyclonal spécifique pour le TNF- $\alpha$  est coâté au fond d'une plaque ELISA type à 96 puits. A l'intérieur de ces puits sont ajoutés 50 $\mu$ L de surnageant de culture obtenu après centrifugation (432g, 10 min) afin d'éliminer les particules résiduelles. Après incubation pendant 2 heures, les puits sont lavés avec la solution de lavage et un anticorps secondaire couplé à une molécule de biotine est ajouté à chaque puits puis incubé une nouvelle fois pendant 2 heures. Après lavage, on introduit alors l'enzyme (HRP) couplée à une molécule de Streptavidine qui va se fixer sur la biotine, c'est une solution qui colore les puits en bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de TNF- $\alpha$  présent dans les puits.

Après 30 min d'incubation, la solution stop est ajoutée et modifie la couleur qui passe du bleu au jaune.

L'absorbance peut alors être mesurée par spectrophotométrie à 450 nm. Les résultats sont exprimés en pg/mL par rapport à la gamme d'étalonnage établie avec les standards des TNF- $\alpha$  connus fournis dans le kit.



**Figure 58: Principe du dosage ELISA du TNF- $\alpha$** (<http://www.sinobiological.com>)

#### II.2.2.4. Stress oxydant : dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Nous avons utilisé deux tests afin d'évaluer le stress oxydant des cellules induit par le contact avec les particules. Ce stress résulte de la formation d'un oxydant puissant, le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (principale substance du pouvoir oxydant des cellules). Le peroxyde d'hydrogène est en effet une substance relarguée par la cellule au cours de la réponse cellulaire.

##### Protocole du dosage type ROS

Pour réaliser ce test, les macrophages sont incubés dans leur milieu de culture à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont incubées 90 minutes avec les particules de boehmite. Durant la période de contact, le peroxyde d'hydrogène libéré est mesuré comme décrit par Delaharpe (Delaharpe & Nathan 1985). La quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ensuite dosée par une méthode d'oxydation de la scopolétine catalysée par une enzyme (la horseradish peroxidase). Nous utilisons donc une solution de dosage contenant de la scopolétine (30µM), NaN<sub>3</sub> (1 mM), de la horseradishperoxidase (HRP) (1 unit./ml).

La scopolétine est dosée après 90 minutes de contact entre les cellules et les particules par fluorescence (la mesure se fait en présence des cellules). Les résultats sont obtenus en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10<sup>6</sup> macrophages.

Pour transformer la fluorescence en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on utilise l'équation de Delaharpe et Nathan.

L'équation suivante permet de calculer la quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libérée par puits après 90 minutes d'incubation.

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ libérées} = \frac{(E_0 - W) - \frac{(E_{90} - W)(C_0 - W)}{C_{90} - W}}{(C_0 - W)} * S$$

*Équation II-8*

E<sub>0</sub> : Fluorescence initiale lue dans un puits

E<sub>90</sub> : Fluorescence lue après 90 minutes

W : Fluorescence enregistrée dans un puits vide

C<sub>0</sub> et C<sub>90</sub> : Fluorescences lues dans les puits de contrôle au instants 0 et 90 minutes.

S : Quantité de scopolétine ajoutée en nanomoles à chaque puits au début du test.

### Protocole de dosage type TOX

Le dosage TOX permet de déterminer la capacité de production maximale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les cellules. Les cellules sont donc incubées avec les particules pendant 24 heures dans leur milieu de culture à 37°C sous une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub>. La libération du peroxyde d'hydrogène est stimulée par l'addition de 100 ng/mL de PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, sigma). La quantité de peroxyde d'hydrogène libérée est mesurée par la même méthode que précédemment. Les résultats sont représentés, d'après la méthode de Bruch (Bruch 2004), en pourcentage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport au témoin positif (quartz DQ12) fixé à 100%.

Le dosage ROS permet de déterminer la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due au stress cellulaire. Le dosage TOX permet de déterminer la capacité de production maximale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les cellules. La mise en parallèle de ces deux valeurs permet d'évaluer un niveau de stress cellulaire mais au final c'est surtout le paramètre ROS qui est regardé, le paramètre TOX étant plus dépendant plus du type cellulaire.

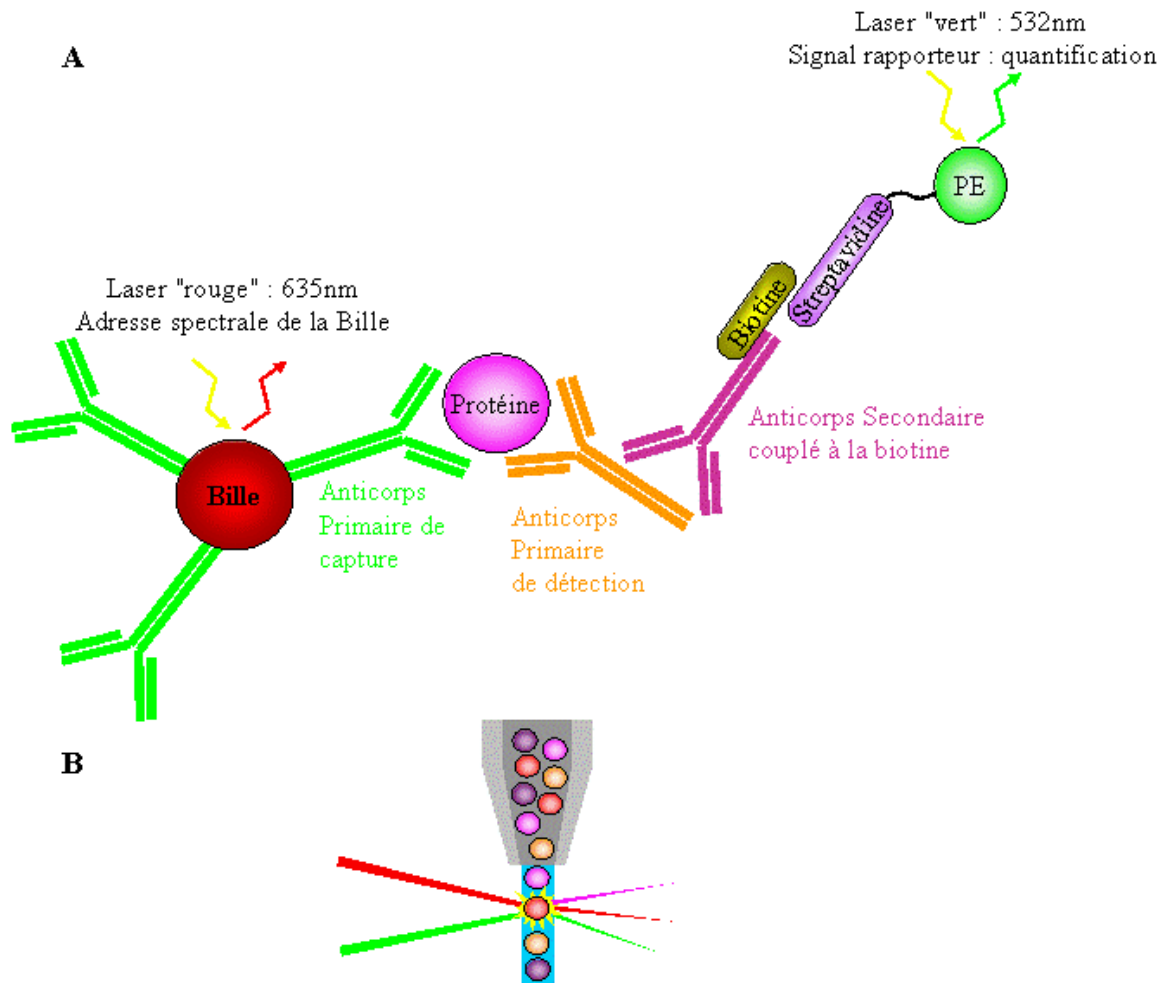
#### II.2.2.5. Dosage des cytokines par technologie Luminex

La Technologie Luminex<sup>TM</sup> est une technologie récente qui est fondée sur le principe de la cytométrie en flux alliant l'utilisation de microsphères fluorescentes et une double lecture après excitation par deux lasers. Il nécessite l'utilisation de billes renfermant un ratio différent de fluorescence rouge et orange. Ces différentes billes peuvent être couplées à leur surface avec des sondes oligonucléotidiques, des peptides ou des anticorps, permettant ainsi la détection d'allèles, d'anticorps ou de peptides simultanément. Nous avons utilisé cet appareil, mis à disposition pour des essais afin de doser plusieurs cytokines pro-inflammatoires en même temps sur nos échantillons, et déterminer s'il était utile pour la suite de nos manipulations d'évaluer la production d'autres cytokines.

##### II.2.2.5.1. *Principe du Luminex*

Les billes sont en polystyrène de 5,6 µm de diamètre. Lors de leur fabrication, deux fluorochromes sont incorporés à l'intérieur. Elles sont recouvertes d'un anticorps de capture. Ces billes, mélangées au début de l'analyse avec l'échantillon, capturent les analytes. La streptavidine qui est l'anticorps fluorescent est ajoutée puis les billes sont ensuite entraînées dans la veine liquide, séparées et identifiées pendant la phase d'acquisition des données. À la sortie de la veine liquide, les billes excitées par le laser rouge à 633 nm vont émettre une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm). Chaque bille réémet d'une façon

différente et sera identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge enregistrées par un capteur à la sortie du flux. Chaque bille a ainsi son propre code couleur d'identification, et plusieurs billes différentes (jusqu'à 100 actuellement) peuvent être mélangées dans un seul tube ce qui multiplie considérablement les possibilités d'analyses (Moalic et al. 2004)(Figure 59).

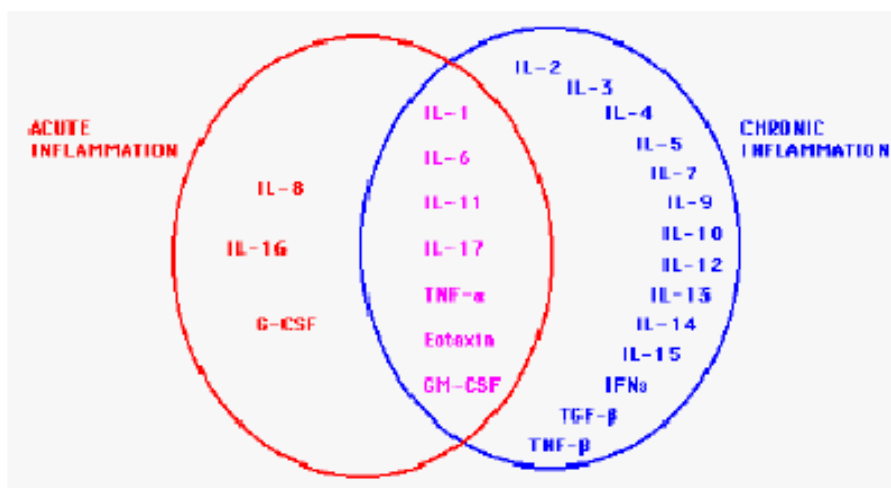


**Figure 59: Principe du dosage de protéines par la technologie Luminex. A : Principe du dosage de protéines par la technologie Luminex : un test Elisa en suspension. B : Système de lecture BioPlex. Le laser rouge détermine l'adresse spectrale et donc l'identité de la bille et de sa protéine cible. Le laser vert quantifie la quantité de phycoérythrine et donc la quantité de protéine cible liée à la bille (Renner 2008)**

### II.2.2.5.2. Choix des cytokines

Nous avons choisi de doser 5 cytokines différentes :

- TNF- $\alpha$  : Cette cytokine nous permet de faire la comparaison avec les résultats obtenus par test Elisa.
- IL-1 $\beta$ , IL-6, et IL-10: ce sont des cytokines sécrétées par les macrophages, impliquées dans la phase de réaction aigüe de la réponse inflammatoire mais aussi chronique, elles ont un rôle central et prépondérant. L'IL-10 a pour rôle aussi de stimuler la production de diverses cytokines et de molécules membranaires par les macrophages activés (Figure 60).



**Figure 60: Les cytokines impliquées dans les réactions inflammatoires aiguës et chroniques.**  
(Feghali & Wright 1997)

- IFN- $\gamma$ : Les Interférons (IFN) sont des protéines naturellement produites par les cellules du système immunitaire, ils jouent un rôle dans l'activation des macrophages (Figure 61). Il serait donc normal de ne pas observer une production lors du contact avec les particules, mais il était indispensable de le vérifier tout de même (Feghali & Wright 1997).

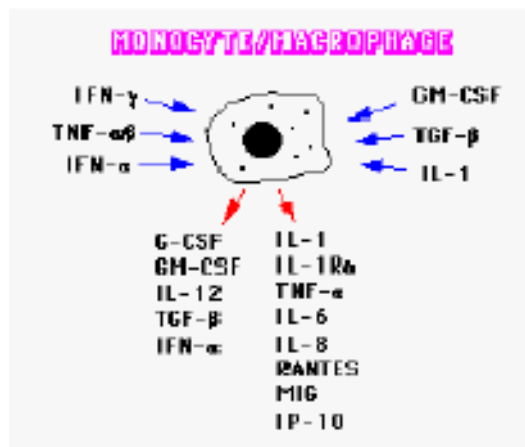


Figure 61: Cytokines inflammatoires du macrophage (Feghali & Wright 1997)

### II.2.2.5.3. Protocole Luminex

Les mesures par Luminex nécessitent l'utilisation d'une plaque adaptée, qui sera préalablement lavée pendant 10 min, ensuite on ajoute dans les différents puits les standards, les contrôles, les échantillons (25µL) suivant le plan de plaque préparé au préalable. On ajoute 25µL de billes dans chaque puits utilisé, puis on laisse incuber toute une nuit à 4°C.

Après l'incubation, les puits sont vidés, rincés et l'anticorps de détection est alors ajouté puis la plaque est laissée 1 heure à température ambiante. Nous ajoutons ensuite la streptavidine.

### II.2.2.6. Analyses statistiques

Les analyses et les graphiques ont été réalisés par Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). La significativité a été établie par test ANOVA ( $p < 0,0001$ ).

## II.2.3. Toxicologie génétique

Le test des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) permet de quantifier directement les altérations primaires de l'ADN (stade initial). Cette technique micro électrophorétique permet de visualiser et de quantifier les cassures d'ADN (simples et doubles) pouvant être induites par des agents physiques ou chimiques toxiques sur différentes cellules : les fibroblastes (Alapetite 1998) ou encore les macrophages (Auffan 2007).

Ce test des comètes est basé sur les travaux de Singh (Singh et al. 1988) et a fait l'objet d'un grand nombre de développements ces dernières années (M De Méo et al. 1991; De Boeck et al. 1998; Hartmann et al. 2003) et a afin démontré sa sensibilité (Burlinson et al.

2007). Il est considéré comme étant l'une des méthodologies les mieux adaptées pour une évaluation de la fragmentation de l'ADN dans le cadre d'études de génotoxicité sur les nanoparticules (Tice et al. 2000; Papageorgiou et al. 2007). Ce test s'avèrera également indispensable pour étudier d'autres aspects de la toxicité des nanoparticules.

#### II.2.3.1. Principe : Tests des comètes

Il existe plusieurs tests de génotoxicité potentiels décrits selon les recommandations de l'OCDE(OECD guideline for the testing oh chemicals 1997). Au vu de notre infrastructure actuelle mais aussi de notre modèle cellulaire et des altérations que nous souhaitons mettre en évidence, nous avons choisi de développer le test de génotoxicité suivant : test des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE).

Les tests ont été réalisés *in vitro* sur notre lignée RAW 264.7 après 24h heures de contact entre les cellules et les particules selon les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les autres analyses de toxicité.

#### II.2.3.2. Mode opératoire

Le protocole suivi dans cette étude est celui décrit par Singh et al. en 1988 et modifié par Devaux et al. (1997). Ces auteurs ont adapté l'essai en appliquant un pH supérieur à 13 au cours de l'électrophorèse. L'essai des comètes en conditions alcalines permet de détecter non seulement les cassures double brin (révélées en pH neutre) mais aussi les lésions simple brin et les sites alcali-labiles générés par la plupart des agents génotoxiques, rendant ainsi l'essai plus sensible. Nous avons choisi de travailler en milieu alcalin en utilisant le kit CometAssay de la société Trevigen.

Les différentes étapes de l'essai sont schématisées sur la Figure 62ci-dessous et décrites ensuite.

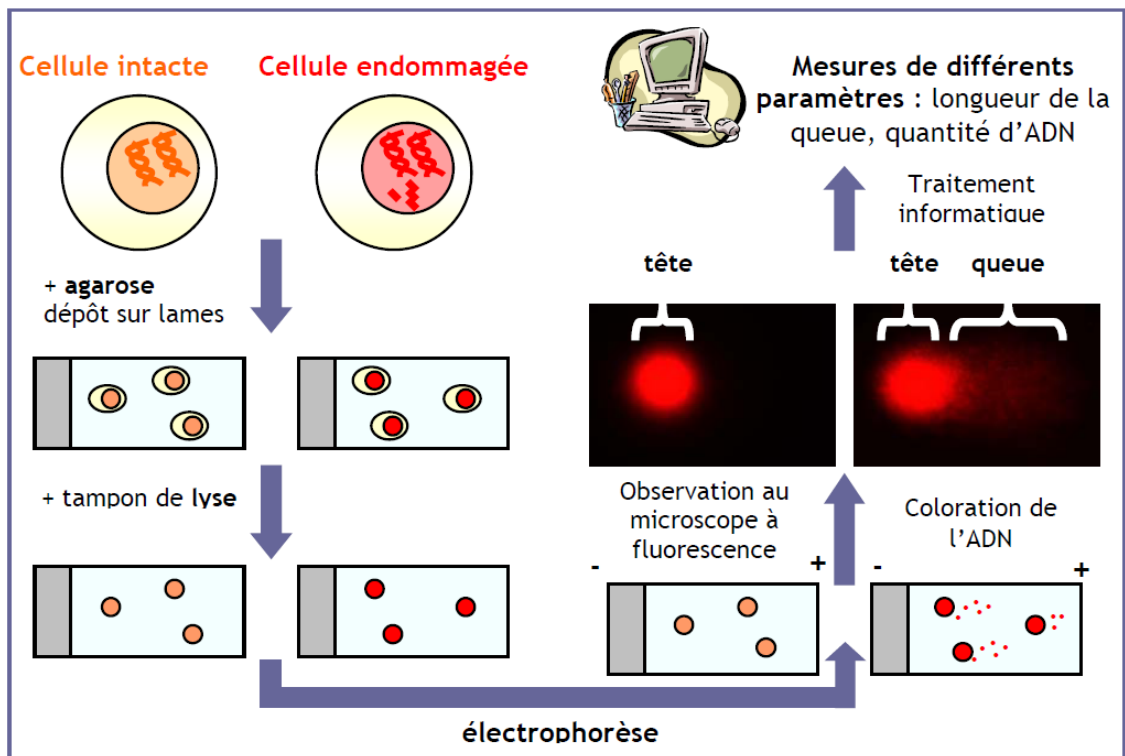


Figure 62: Principe du test des comètes (Monleau 2005)

Nous avons choisi de travailler avec le kit TREVIGEN à l'aide d'un format de lames à 20 puits.

### Suspension cellulaire

Après 24h de contact entre les cellules et les particules, les cellules sont centrifugées et le culot cellulaire est repris avec le tampon phosphate 0.01M (PBS dépourvu d'ions calcium et magnésium) afin d'obtenir une suspension cellulaire initiale de 1 million par ml.

### Préparation des lames

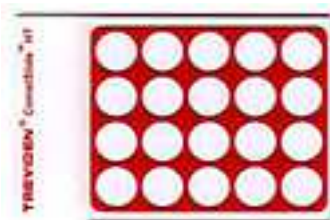


Figure 63: Lames 20 puits (Trevigen)

Les cellules à la bonne densité cellulaire sont mélangées à un volume adéquat d'agarose préalablement chauffé à 37°C puis déposées sur des lames préalablement recouvertes d'un gel d'agarose (Trevigen). La concentration finale est de 1000 cellules par lame (Figure 63). Les



cellules sont donc emprisonnées dans le gel, les lames sont ensuite disposées sur une surface plane à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à ce que la polymérisation du gel se réalise uniformément et qu'un anneau de gélification apparaisse (environ 1h) pour les différents puits de la lame.

#### Traitement des lames

L'ADN étant sensible aux rayonnements lumineux, l'ensemble des étapes suivantes (lyse, déroulement, électrophorèse et neutralisation) sont effectuées à l'obscurité.

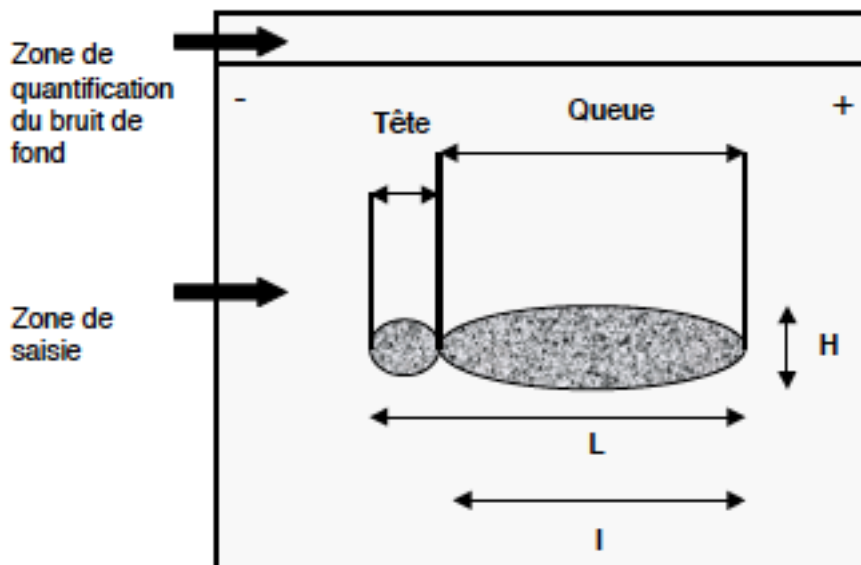
Les lames recouvertes d'agarose sont immergées 90 min dans un tampon de lyse à 4°C (Trevigen). Les membranes plasmique et nucléaire ainsi que les organites du cytoplasme, les protéines liées à l'ADN (histones et non histones) sont lysées et dénaturées sous l'action de la force ionique importante des sels et des détergents du tampon de lyse. Les lames sont ensuite séchées, transférées dans une solution alcaline pendant 25min à 4°C fraîchement préparée (NaOH, EDTA, pH>13). Le déroulement de l'ADN ainsi que sa dénaturation, nécessaire pour visualiser les cassures simples brins, s'effectuent dans ce tampon alcalin durant 25min. Une courte électrophorèse (de faible voltage et ampérage) est ensuite réalisée permettant la migration de l'ADN chargé négativement vers l'anode dans le gel d'agarose soumis à un champ électrique. L'électrophorèse se réalise pendant 20 min à 25V et 300mA. Les cassures au sein de la molécule d'ADN génèrent des fragments dont la distance de migration est inversement proportionnelle à leur taille, les petits fragments migrant plus que les gros donnent un aspect de "comètes" aux cellules dont l'ADN présente un certain nombre de cassures simple et/ou double brin. L'ADN intact quant à lui ne migre pas et l'ADN apparaît sous forme d'une sphère compacte de 25-35 µm de diamètre environ.

Après électrophorèse, les lames sont retirées du tampon et égouttées. Une solution de neutralisation (Tris, pH 7,4) est déposée avec précaution sur les lames et agit durant 5 min. L'opération est renouvelée deux fois pour parfaire la neutralisation. Les lames sont rincées à l'eau milli-Q puis déshydratées durant 5 min dans de l'éthanol 70%. Ensuite les lames sont marquées au SybrGreen (Trevigen), séchées et stockées à l'abri de la poussière et à température ambiante en attendant de pouvoir réaliser l'analyse.

#### Lecture des lames

L'observation des lames s'effectue avec un microscope à épifluorescence motorisé BX61 de chez Olympus à l'aide du filtre adapté pour la fluorescence du SyberGreen (excitation/émission : 494nm/521nm). Le microscope est relié à une caméra Comet assay IV Image de chez perspective instruments incluant une caméra haute résolution monochrome type Basler Scout scA 1300-32fm. Le champ du microscope peut être visualisé sur un moniteur. Une fois « capturée », l'image est simultanément transférée sur un écran ordinateur

(acquisition en temps réel) où un système d'analyse d'image (Comet assay IV) permet de mesurer de manière automatique ou manuelle différents paramètres de la comète (Figure 64).



**Figure 64:** Représentation schématique d'un noyau sous la forme d'une comète,  $L$  : longueur de la comète,  $l$  : largeur de la comète,  $H$  : hauteur de la queue, + : anode, - : cathode (Larno 2002)

Le test des comètes est réalisé en duplicate pour chaque condition pour lesquelles 100 noyaux minimum sont analysés. L'interprétation du test des comètes met en jeu l'analyse de divers paramètres parmi lesquels « Olive Tail Moment » (OTM, exprimé en % d'ADN par  $\mu\text{m}$ ). C'est le produit du pourcentage d'ADN réparti dans la queue de la comète par la distance tête queue (Olive et al. 1990). Plus les lésions d'ADN sont importantes, plus les fragments seront abondants et migreront loin et plus l'OTM sera élevé. Ce test analysant les cellules individuelles, l'analyse statistique des OTM montre une grande hétérogénéité. Il est donc nécessaire de raisonner sur les fréquences de distribution des OTM (Bauer et al. 1998) et d'utiliser la fonction  $\chi^2$  qui présente une asymétrie pour une réponse faible et une distribution tendant vers la loi normale pour une réponse forte. Ainsi, il est possible de calculer le degré de liberté «  $n$  » de cette fonction non linéaire (également appelé OTM  $\chi^2$ ) qui est un paramètre quantitatif du niveau d'altération de l'ADN. Ce paramètre peut être utilisé comme un paramètre global. Lorsque  $n$  augmente (cellules endommagées), la fonction tend vers une forme gaussienne (Jean et al. 2001) et il faut que  $n$  soit supérieur à 2 pour traduire correctement les distributions obtenues avec le test des comètes.

$$\text{Fonction } \chi^2: P(\chi^2) = \frac{\left(\chi^2\right)^{\frac{n}{2}-1} * e^{-\frac{1}{2}\chi^2}}{2^{\frac{n}{2}} * \Gamma\left(\frac{n}{2}\right)}$$

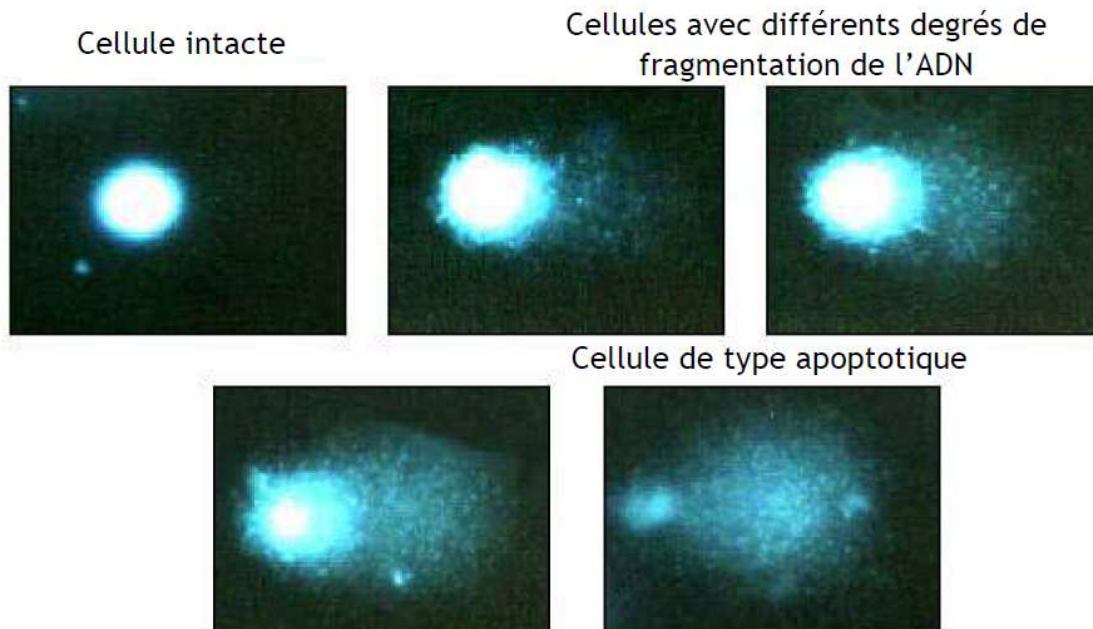
*Équation II-9*

$$\text{Avec gamma tel que : } \Gamma\left(\frac{n}{2}\right) = \int_0^{\infty} e^{-t} * t^{\frac{n}{2}-1} dt$$

*Équation II-10*

Lorsque 100 OTM ont été mesurés sur un échantillon, il est possible d'obtenir la distribution de ces valeurs grâce à la détermination de fréquences normalisées. Grâce à un logiciel nous déterminons l'équation de la fonction  $\chi^2$  qui représente le mieux cette distribution et qui permet ensuite de déterminer le degré de liberté n. Nous obtenons alors une valeur de OTM $\chi^2$  par condition (Bauer et al. 1998; Monleau 2005).

De plus, l'évaluation de la viabilité est souvent un point essentiel pour interpréter le test des comètes. Des cellules apoptotiques qui présentent une fragmentation de l'ADN peuvent par là induire de fausses réponses positives. De telles cellules génèrent cependant des comètes avec un profil atypiques (petite tête avec queue sous forme d'halo diffus) facilement identifiables dénommées cellules fantômes (Figure 65), qu'il est possible grâce au logiciel de soustraire du compte global.



*Figure 65: Différents niveaux de fragmentation de l'ADN observable par le test des comètes (Collins 2004; Monleau 2005)*



# Chapitre III. DONNÉES PHYSICOCHEMIQUES DES PARTICULES DE BOEHMITE



# SOMMAIRE

Chapitre III. Données Physicochimiques des particules de boehmite	139
---	-----

## **III.1. Les poudres industrielles \_\_\_\_\_ 143**

III.1.1. Forme et granulométrie _____	143
III.1.2. Potentiel zêta et point isoélectrique _____	154
III.1.3. Evaluation de l'agrégation _____	157
III.1.4. Fraction aérosolisée _____	159
III.1.5. Surface spécifique _____	162
III.1.6. Structure cristalline _____	164
III.1.7. Analyse chimique et de surface des nanopoudres de boehmite _____	165
III.1.8. Solubilité _____	167
III.1.9. Résonance Paramagnétique Electronique _____	168
III.1.10. Conclusion intermédiaire _____	170

## **III.2. Posts-Traitements appliqués aux particules industrielles \_\_\_\_\_ 174**

III.2.1. Récupération de la fraction fine _____	174
III.2.2. Broyage _____	175
III.2.3. Données physico-chimiques des particules après traitements _____	177
III.2.4. Conclusion intermédiaire _____	179

## **III.3. Nanoparticules réalisées par synthèse hydrothermale à l'échelle du laboratoire \_\_\_\_\_ 180**

III.3.1. Forme et granulométrie _____	180
III.3.2. Potentiel zêta et point isoélectrique _____	191
III.3.3. Surface spécifique _____	192
III.3.4. Structure cristalline _____	193
III.3.5. Analyse chimique des poudres de boehmite _____	194

III.3.6. Conclusion intermédiaire	195
<b>III.4. Conclusion</b>	<b>197</b>



Ce chapitre sera consacré aux résultats de caractérisations physico-chimiques des particules industrielles de boehmite fournies par notre partenaire industriel, mais aussi des nanoparticules élaborées par synthèse hydrothermale à l'échelle du laboratoire par l'école des Mines de Paris.

Dans un premier temps nous présenterons les résultats de granulométrie, de morphologie, de chimie, de structure cristalline et d'activité radicalaire obtenus à l'aide des techniques présentées au Chapitre II pour les différentes particules industrielles. Dans un deuxième temps nous présenterons les différents traitements (broyage, élutriation) que nous avons effectués sur nos échantillons de particules industrielles pour pouvoir récupérer des particules représentatives de la fraction alvéolaire. C'est-à-dire la fraction dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 10  $\mu\text{m}$ , particules qui sont donc susceptibles de pénétrer par inhalation. Nous avons réalisé des étapes de broyage et utiliser un impacteur en cascade afin de récupérer des fractions fines. Et dans une troisième partie nous présenterons les données physico-chimiques obtenues pour les particules élaborées par synthèse hydrothermale.

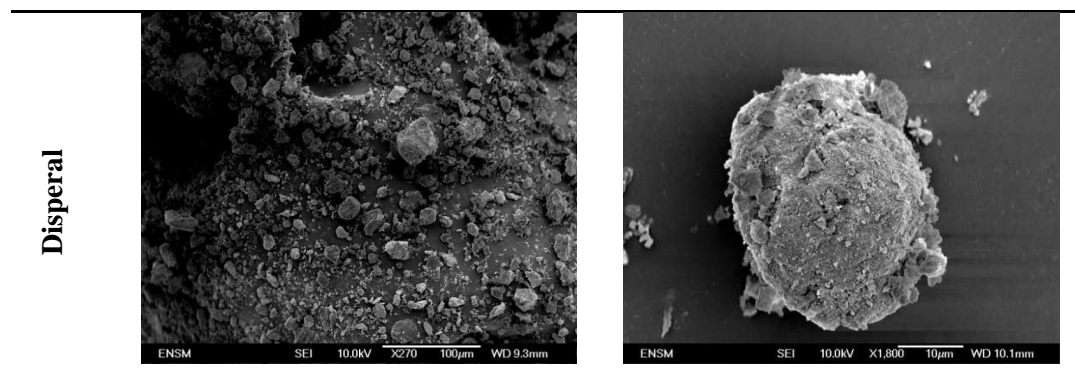
### **III.1. Les poudres industrielles**

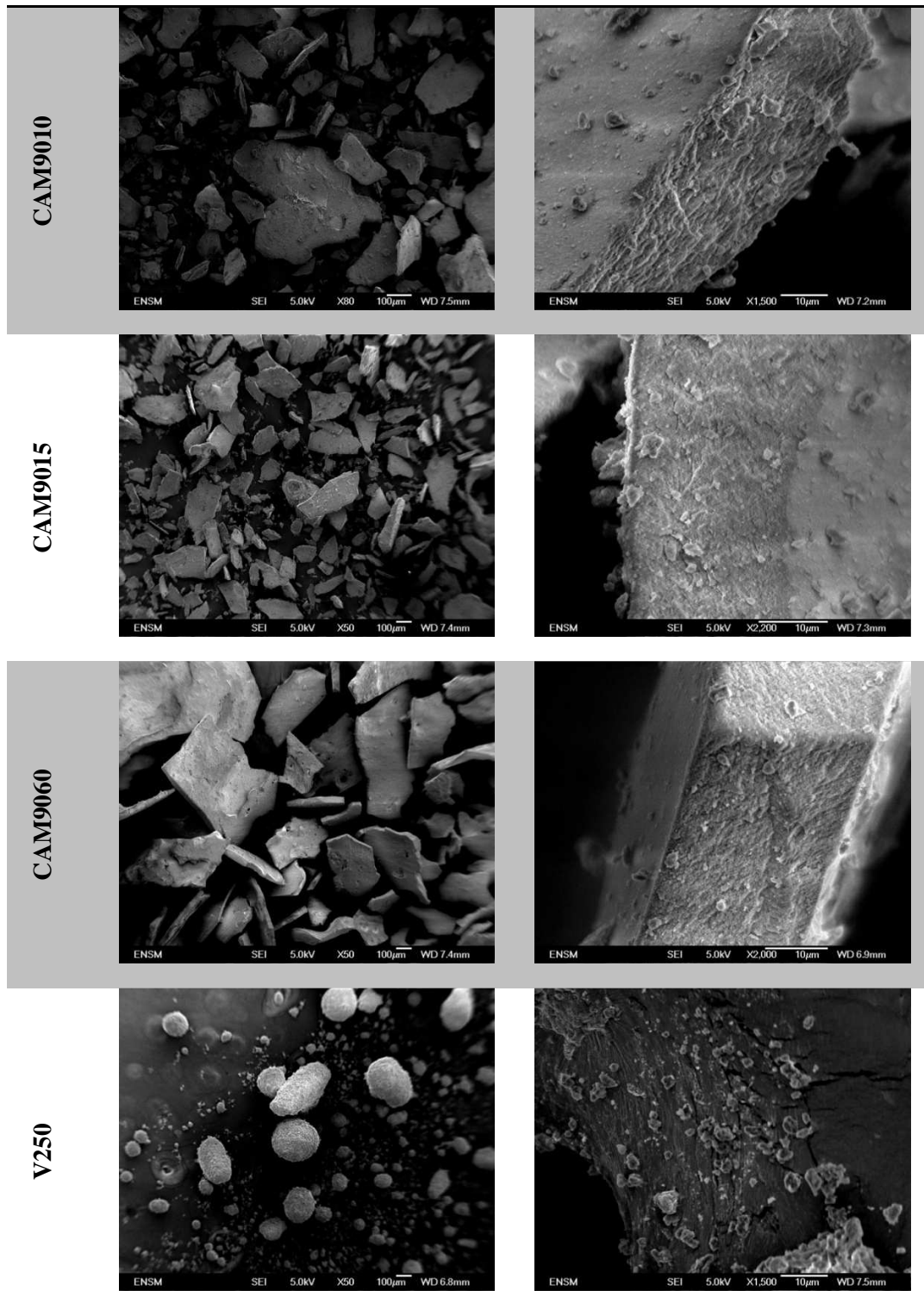
Nous allons étudier six types de particules industrielles différentes.

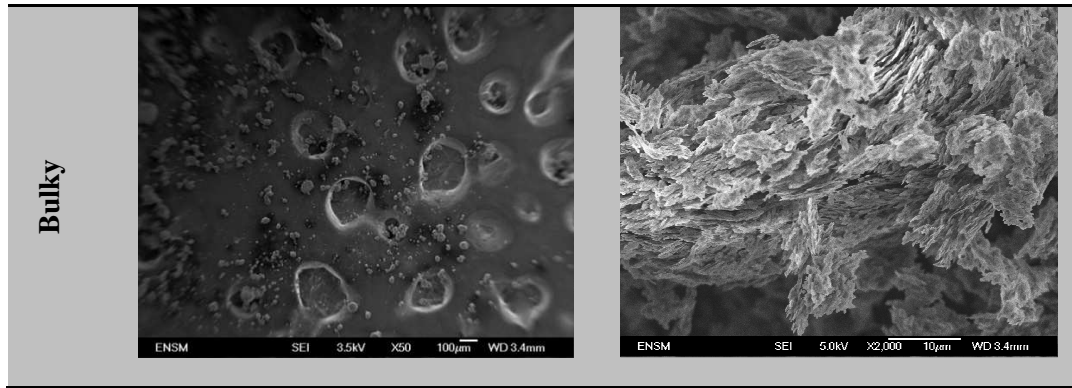
#### **III.1.1. Forme et granulométrie**

##### **III.1.1.1. Morphologie des particules**

Nous avons tout d'abord réalisé une analyse de la morphologie de nos diverses particules industrielles : microscopie électronique à balayage, granulométrie laser et spectroscopie à corrélation de photons qui permet ainsi d'avoir des informations sur la taille, la forme et l'aspect de surface des particules (Figure 66).







**Figure 66: Observations microscopiques de particules de boehmite (MEB-FEG)**

L'échelle représente 100 $\mu$ m pour les clichés de gauche et 10 $\mu$ m pour les clichés de droite.

Les différents échantillons étudiés sont polydisperses et possèdent des morphologies différentes. Les particules dispersées sont de formes plutôt sphériques et forment des agglomérats de différentes tailles (1 à 20  $\mu$ m). Les différents types de particules CAM possèdent des morphologies semblables. Elles ressemblent à des plaquettes entre 20 et 500  $\mu$ m. Elles ont un aspect de surface lisse et montrent des particules plus petites (2 à 5  $\mu$ m) fixées sur les agglomérats. Les particules V250 sont sous forme sphériques. Elles sont agglomérées pour former des agglomérats de 10 à 300  $\mu$ m. En ce qui concerne les particules de bulky, nous observons une forme différente des autres types de particules. Elles sont en effet sous forme de feuillets d'environ 5  $\mu$ m de côté et agglomérées pour former des agglomérats de 10 à 100  $\mu$ m.

Dans le tableau suivant (Tableau 5) sont récapitulées les observations microscopiques.

<b>Echantillons</b>	<b>Morphologie</b>	<b>Taille en <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Monodisperse ou polydisperse</b>
<b>Disperal</b>	Sphère	1 à 20	Polydisperse
<b>CAM9010</b>	Plaquette	20 à 500 2 à 5	Polydisperse
<b>CAM9015</b>	Plaquette	20 à 500 2 à 5	Polydisperse
<b>CAM9060</b>	Plaquette	20 à 500 2 à 5	Polydisperse
<b>V250</b>	Sphère	10 à 300	Polydisperse
<b>Bulky</b>	Feuillet	5 à 100	Polydisperse

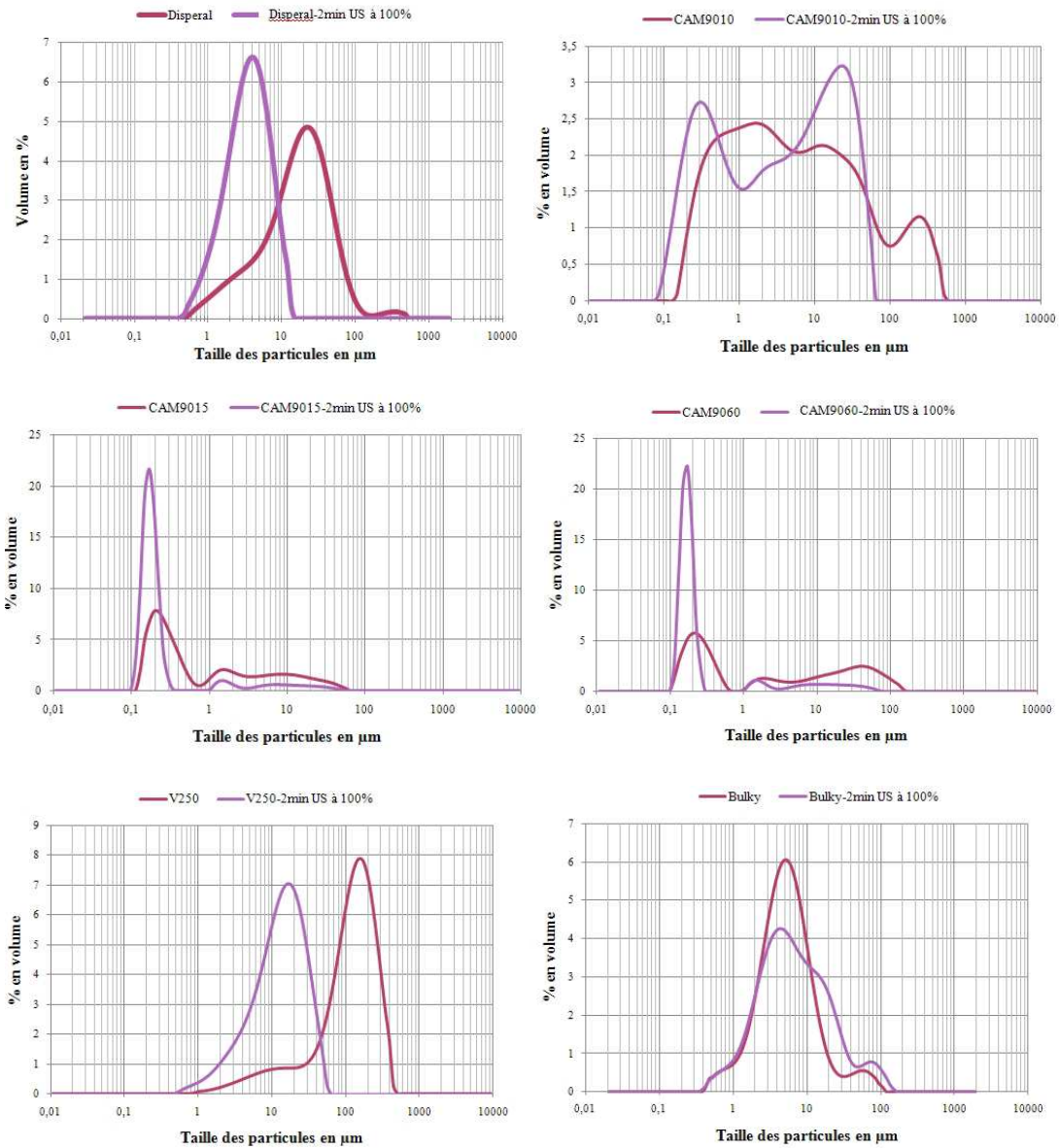
*Tableau 5: Récapitulatif des observations microscopiques*

### III.1.1.2. Granulométrie des particules

#### III.1.1.2.1. *Granulométrie par diffraction laser*

La distribution en taille a été mesurée par granulométrie par diffraction laser à l'aide de l'appareil Mastersizer 2000. Les mesures ont été réalisées en voie liquide en utilisant l'eau comme dispersant et la sonde à ultrasons interne de l'appareil au maximum de puissance (100%) c'est-à-dire 26W pour 0,1g de particules.

Nous représentons les résultats dans les figures suivantes (Figure 67) en traçant la distribution globale en volume. La distribution nous donne une indication importante sur la répartition des particules en suspension.



**Figure 67: Distribution en taille par granulométrie laser des différentes particules de boehmite brute et après 2 min d’ultrasons**

Le tableau suivant rassemble les valeurs obtenues pour le diamètre médian  $D_{50}$  pour les différentes particules de boehmite avant puis après 2 min d’ultrasons.

Echantillons	Granulométrie Diamètre médian D <sub>50</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Granulométrie Diamètre médian D <sub>50</sub> ( $\mu\text{m}$ ) après 2min d'ultrasons (26W)	Monodisperse ou polydisperse
<b>Disperal</b>	17,29	3,51	Majoritairement monodisperse
<b>CAM9010</b>	4,54	3,68	Polydisperse
<b>CAM9015</b>	0,39	0,14	Polydisperse
<b>CAM9060</b>	1,75	0,17	Polydisperse
<b>V250</b>	124,60	13,27	Majoritairement monodisperse
<b>Bulky</b>	5,20	6,10	Polydisperse

*Tableau 6: Granulométries des différentes particules de boehmite avant et après ultrasons*

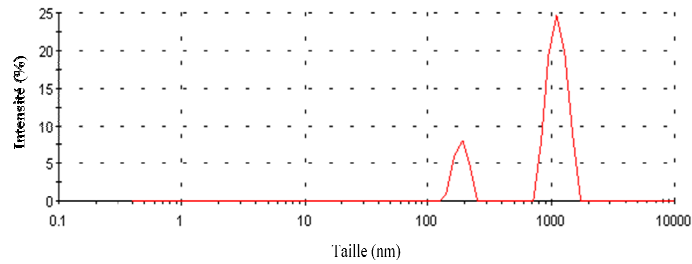
Les particules de disperal ainsi que les particules de V250 sont majoritairement monodisperses dans nos conditions de mesures contrairement aux autres types de particules CAM et bulky qui sont polydisperses.

Les particules de disperal ont un diamètre médian de 17,29 $\mu\text{m}$  et après 2 min d'ultrasons nous observons une désagglomération et donc un diamètre médian plus petit, de 3,51  $\mu\text{m}$ . Les particules de CAM ont des diamètres médians compris entre 4,5 et 0,39  $\mu\text{m}$ . Ce sont les plus petits parmi nos différents types de particules. Après 2 min d'ultrasons nous observons une légère désagglomération amenant à des diamètres médians compris entre 0,14 et 3,68  $\mu\text{m}$ . Les particules V250 sont les plus grosses, elles possèdent un diamètre médian de 124,6  $\mu\text{m}$ . Il faut signaler aussi que ces particules ont un fort pouvoir de désagglomération car après seulement 2 min d'ultrasons le diamètre médian de 13,27  $\mu\text{m}$ . Enfin les particules de bulky possèdent un diamètre médian de 5,20  $\mu\text{m}$  et contrairement aux autres particules, elles ont tendance à s'agglomérer après les ultrasons, nous obtenons alors un diamètre médian légèrement plus élevé, 6,10 $\mu\text{m}$ .

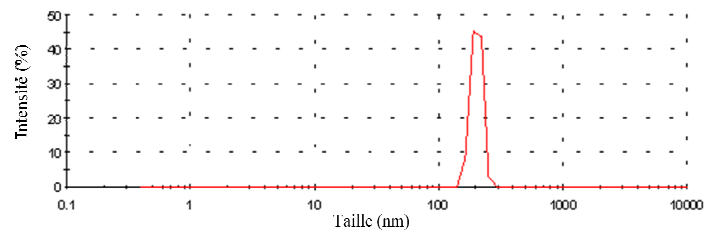
Après ultrasons certaines tendances se dégagent et notamment trois familles avec tout d'abord les particules de CAM 9015 et 9060 qui ont une taille inférieure à 200nm, ensuite les particules comprises entre 200nm et 5 $\mu\text{m}$  comme les particules de disperal et de CAM9010 et enfin les plus grosses particules dont le diamètre médian est supérieur à 5 $\mu\text{m}$ , les particules de V250 et de bulky.

### III.1.1.2.2. Spectroscopie de corrélation de photons

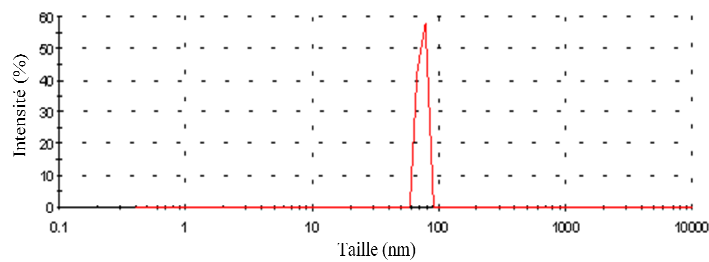
Les mesures par spectroscopie de corrélations de photons sont réalisées dans l'eau ultra pure mQ (Millipore) à pH 6,8. Les résultats pour les différentes particules sont représentés en intensité de lumière diffusée en fonction de la taille en nm (Figure 68).



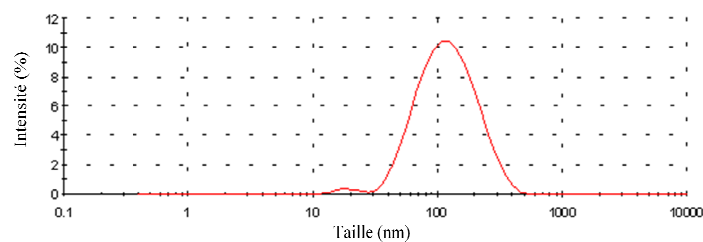
Disperal



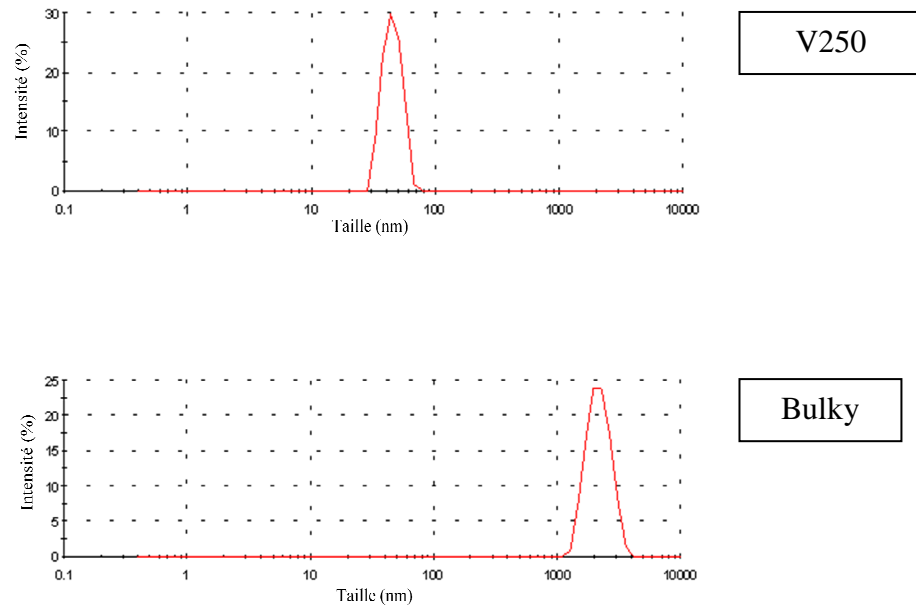
CAM9010



CAM9015



CAM9060



**Figure 68: Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des différentes particules de boehmite dans l'eau**

Echantillons	Granulométrie (nm)	Monodisperse ou polydisperse
<b>Disperal</b>	185,5 et 1125	Polydisperse
<b>CAM9010</b>	202,8	Monodisperse
<b>CAM9015</b>	74,8	Monodisperse
<b>CAM9060</b>	19,3 et 133,6	Polydisperse
<b>V250</b>	45	Monodisperse
<b>Bulky</b>	2201	Monodisperse

**Tableau 7: Granulométries des différentes particules de boehmite dans l'eau par spectroscopie de corrélation de photons**

La spectroscopie de corrélation permet d'observer les particules nanométriques contrairement à la granulométrie par diffraction laser qui a une limite de détection plus élevée.

Nous constatons que deux types de particules sont polydisperses (disperal et CAM9060) alors que les autres particules sont monodisperses. Elles possèdent des tailles variant de 19 à 2200nm qui nous amène à les classées en trois parties. Tout d'abord les particules V250, CAM 9060, CAM9015 et CAM 9010 confirment la présence de particules non fortement agglomérées, comprises entre 19 et 200nm. Il y a ensuite les particules disperal qui possèdent

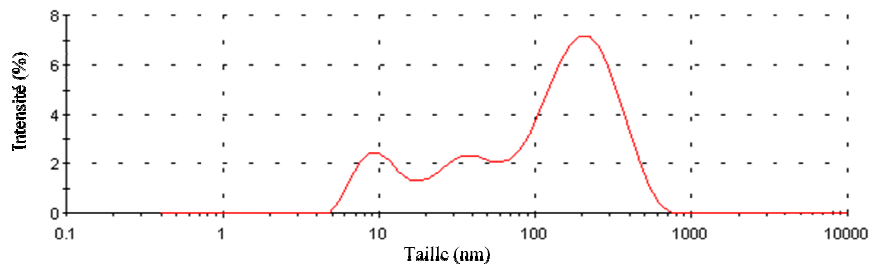


deux populations, des particules agglomérées en agglomérats submicroniques (185,5nm) et des particules agglomérées en agglomérats microniques (1125nm) et enfin les particules de Bulky agglomérées en très gros agglomérats microniques (2201nm).

Nous observons donc des différences entre les particules aux niveaux des tailles.

Les deux techniques utilisées pour la granulométrie des particules (granulométrie par diffraction laser et spectroscopie de corrélation de photons) montrent des résultats différents et complémentaires. En effet la spectroscopie de corrélation de photons ne permet pas de voir des particules de grosses tailles, supérieures à quelques microns et la granulométrie laser n'est pas adaptée pour les nanoparticules. Donc malgré des concentrations de solutions identiques pour les différentes techniques et dans ce cas où il n'y a pas d'ultrasons, nous retrouvons des résultats différents.

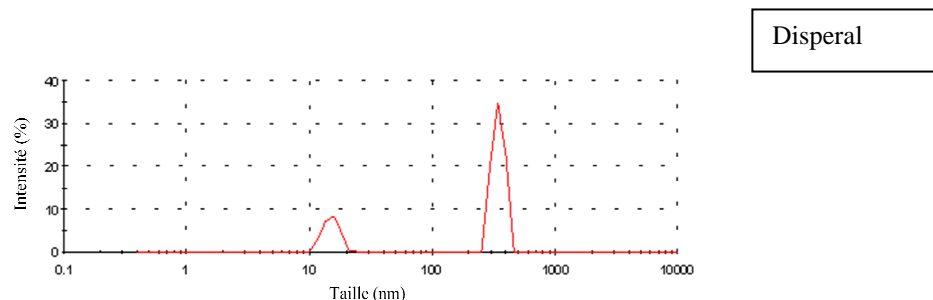
Nous avons ensuite réalisé nos mesures dans le milieu de culture utilisé pendant cette étude (DMEMc). Celui-ci comprenant du glucose, de la glutamine, du sérum de veau et de la pénicilline nous avons préalablement réalisé la mesure pour le DMEMc seul (Figure 69).

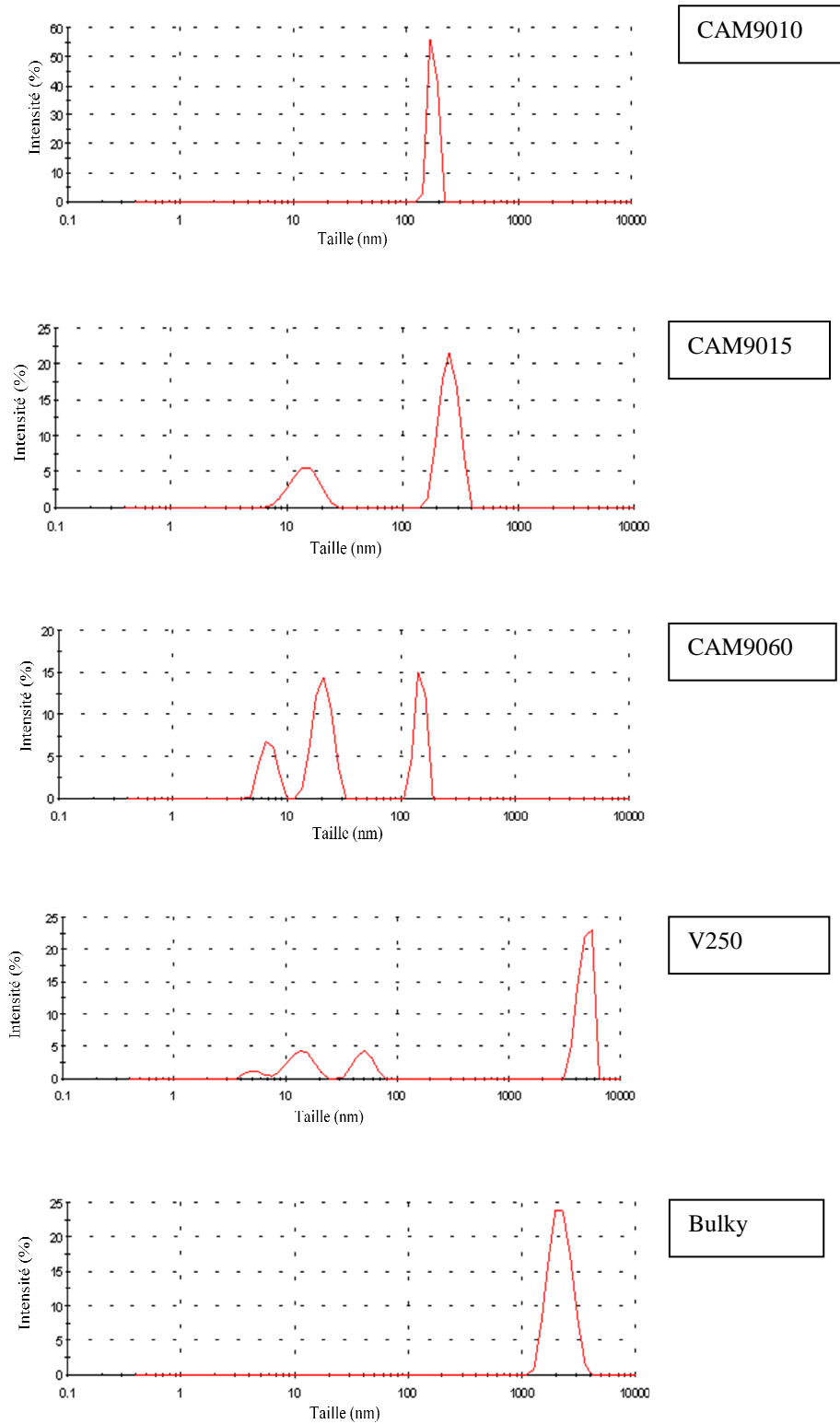


**Figure 69: Distribution en intensité du milieu de culture (DMEMc)**

Nous observons alors une distribution présentant trois modes principaux de faible intensité. L'intensité mesurée par l'appareil est nettement inférieure pour le DMEMc seul par rapport aux différentes suspensions étudiées, ce qui confirme que le bruit de fond du DMEMc est négligeable par rapport aux nanoparticules de boehmite.

Nous avons ensuite réalisé des mesures de taille des différentes particules dans le milieu de culture à pH 7 (Figure 70).





*Figure 70: Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des différentes particules de boehmite dans le milieu de culture*

Echantillons	Granulométrie en nm Eau	Monodisperse ou polydisperse	Granulométrie en nm DMEMc	Monodisperse ou polydisperse
<b>Disperal</b>	185,5 et 1125	Polydisperse	15,4 et 459,9	Polydisperse
<b>CAM9010</b>	202,8	Monodisperse	174,4	Monodisperse
<b>CAM9015</b>	74,8	Monodisperse	14,67 et 255,1	Polydisperse
<b>CAM9060</b>	19,3 et 133,6	Polydisperse	6,9 ; 20,7 et 147,5	Polydisperse
<b>V250</b>	45	Monodisperse	13,93 ; 50,73 et 4833	Polydisperse
<b>Bulky</b>	2201	Monodisperse	1393	Monodisperse

**Tableau 8: Granulométries des différentes particules de boehmite dans le milieu de culture DMEMc par spectroscopie de corrélation de photons**

Les mesures ont été réalisées pour des solutions de même concentration,  $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  et sans ultrasons pour ne pas altérer les composés biologiques présents dans le milieu de culture et être dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats obtenus dans l'eau et dans le DMEMc sont donc comparables.

Ces résultats nous permettent de voir que les particules de boehmite ne se comportent pas de la même manière dans l'eau ou dans le DMEMc.

Premièrement nous constatons que des particules se montrent monodisperses dans l'eau et polydisperses dans le milieu de culture, c'est le cas des particules de CAM 9015 et de V250. Les particules de disperal, et CAM 9060 sont polydisperses aussi bien dans l'eau que dans le DMEMc et les particules de CAM 9010 et de bulky sont monodisperses aussi bien dans l'eau que dans le DMEMc.

Des tendances se dégagent pour certaines particules qui se montrent plus agglomérées pour un même pH dans l'eau que dans le DMEMc.

Elles possèdent des tailles variant de 7 à 2200nm qui nous permet de les classer de la même manière que précédemment. Tout d'abord les particules Disperal, CAM9015, CAM9060 et V250 confirme la présence de particules non fortement agglomérées, comprises entre 7 et 200 nm. Il y a ensuite les nanoparticules fortement agglomérées en agglomérats submicroniques c'est le cas des particules de disperal (459,9nm), de CAM 9010 (174,4nm),

de CAM 9015 (255nm) et de CAM 9060 (147 nm) et enfin les très gros agglomérats microniques pour les particules de V250 (4833nm) et de bulky (1393nm).

Nous constatons généralement une diminution de la taille des particules dans le DMEMc par rapport aux résultats obtenus dans l'eau hormis pour les particules de CAM 9015 et de V250 qui ont tendance à s'agglomérer.

En conclusion en ce qui concerne la taille des particules, les différentes techniques utilisées sont complémentaires et nous ont permis de classer les particules étudiées en différents groupes :

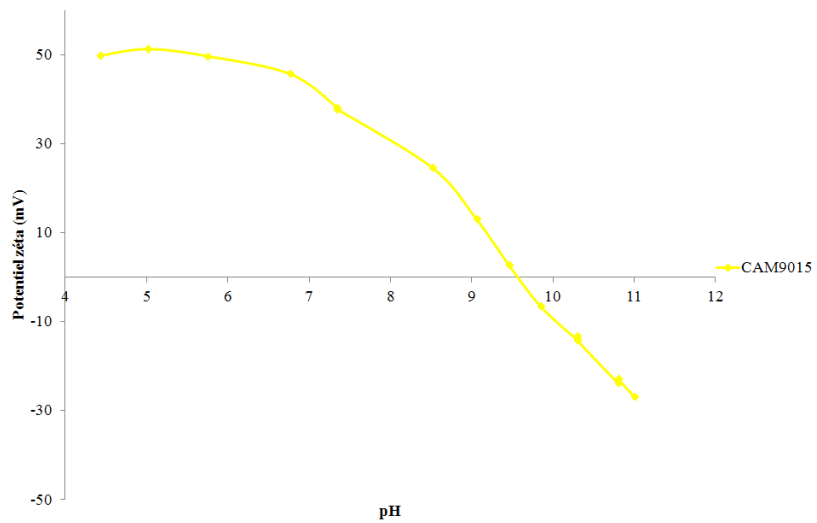
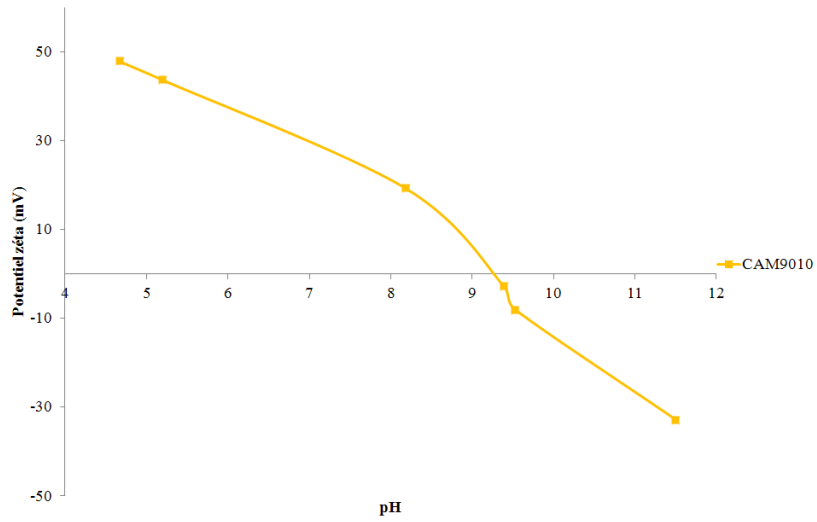
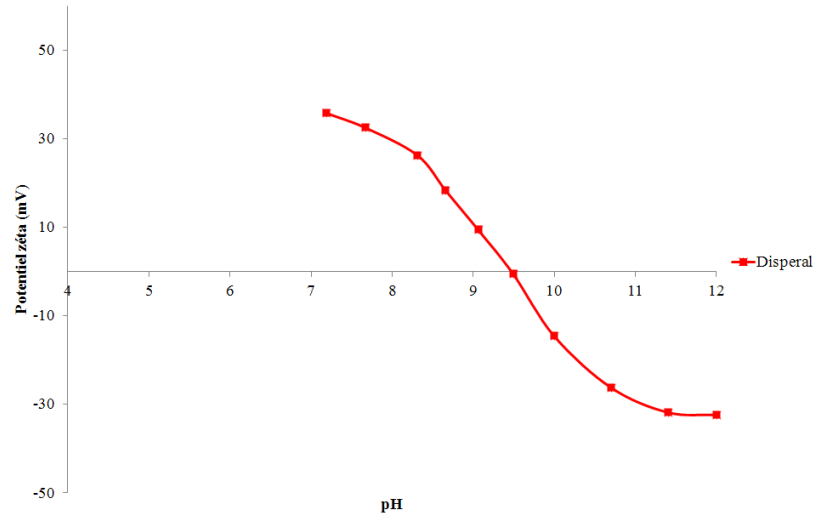
- les particules non fortement agglomérées (<200nm): CAM 9010, CAM 9015, CAM 9060 et V250
- les particules fortement agglomérées en agrégats submicroniques (entre 200 et 1000nm) et en agrégats microniques (>1000nm): disperal
- les très gros agglomérats microniques (>1000nm): bulky

### III.1.2. Potentiel zêta et point isoélectrique

La charge surfacique que les nanoparticules acquièrent grâce aux ions qui les entourent ou potentiel zêta a été mesurée à différents pH. Le point isoélectrique qui est le pH pour lequel la charge de la particule est nulle a été déterminé ainsi que les valeurs des potentiels zêtas dans les conditions d'exposition durant les tests biologiques (DMEMc) mais aussi dans l'eau (Figure 71).

Echantillons	pI	$\xi_{\text{eau}}$ en mV	$\xi_{\text{DMEMc}}$ en mV
<b>Disperal</b>	9,4	35,2	-10,1
<b>CAM9010</b>	9,24	27,3	-11
<b>CAM9015</b>	9,60	42,7	-12,2
<b>CAM9060</b>	8,95	28,0	-9,48
<b>V250</b>	8,85	15,4	-10,5
<b>Bulky</b>	8,26	9,5	-12

*Tableau 9: Point isoélectrique des particules et potentiel zêta dans l'eau et le DMEMc à pH 7*



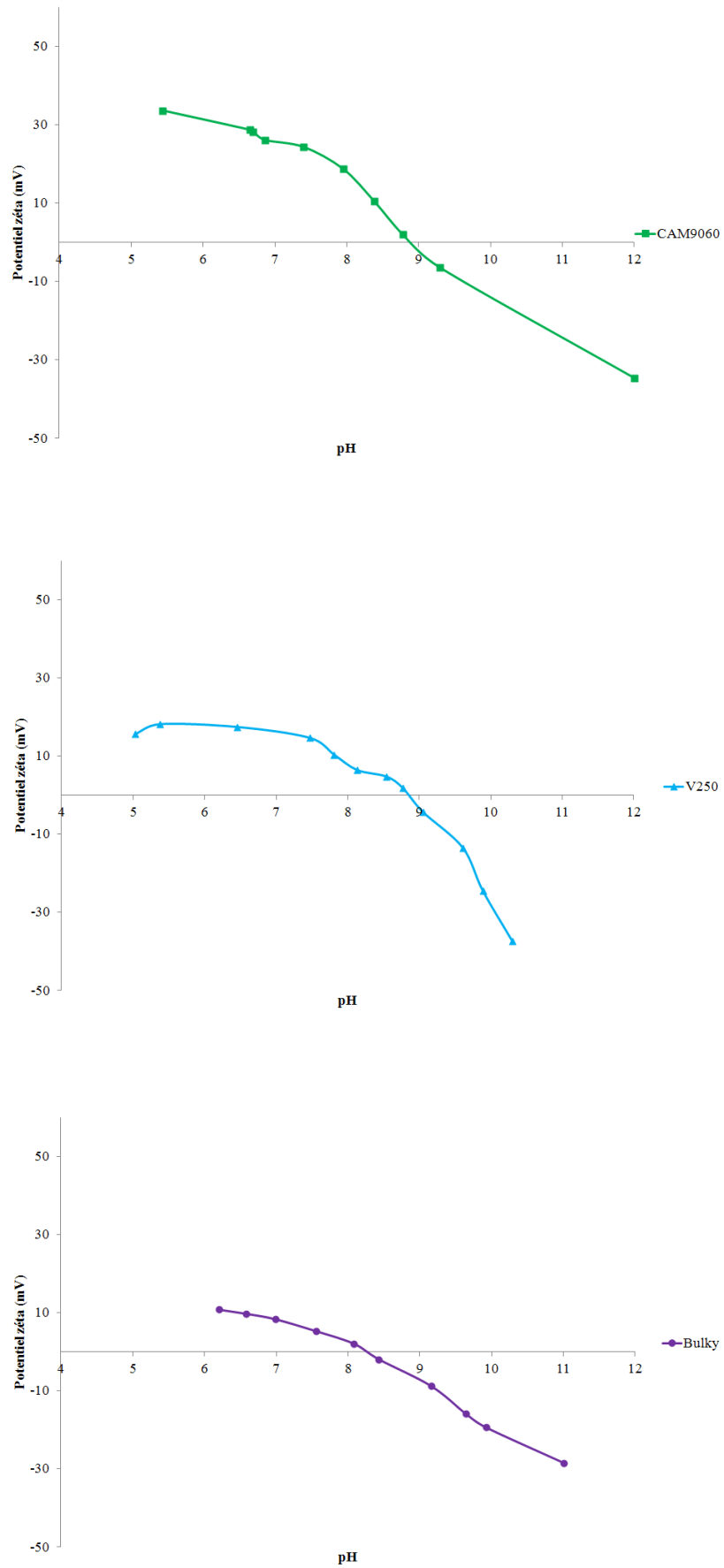


Figure 71: Courbes de potentiels zétas des différentes particules de boehmite étudiées dans l'eau

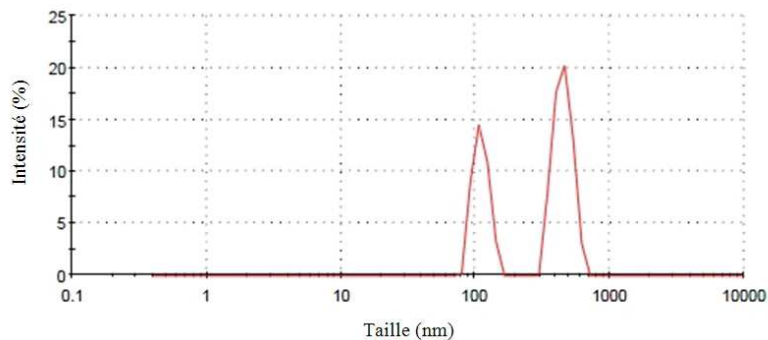
A pH 7, les particules sont chargées positivement dans l'eau alors que dans le DMEMc les particules sont chargées négativement. Les particules devraient avoir tendance à s'agglomérer dans le milieu de culture, or les résultats obtenus nous montrent que seules les particules de CAM 9015 et V250 ont tendance à légèrement s'agglomérer dans ces conditions. Les points isoélectriques des différents types de particules se trouvent entre pH 8,2 et 9,6.

Nous constatons que les potentiels zêtas des différents types de particules sont très différents dans l'eau alors qu'ils sont proches dans le DMEMc. Ceci est peut être dû à l'adsorption de biomolécules comprises dans le DMEMc sur les particules de boehmite. Cette adsorption entraînerait alors un changement du potentiel zêta pour les différentes particules.

### III.1.3. Evaluation de l'agrégation

L'intérêt d'utiliser la spectroscopie de corrélation de photons est de montrer l'agglomération des particules en suspension en fonction du pH de celle-ci (pH ajusté par ajout de HCl ou NaOH, 0,1M). Nous avons réalisé trois suspensions à pH différents en utilisant les particules de boehmite brute « Disperal » dans l'eau ultrapure mQ (Millipore). Pour chacune des suspensions les résultats seront représentés en intensité de lumière diffusée.

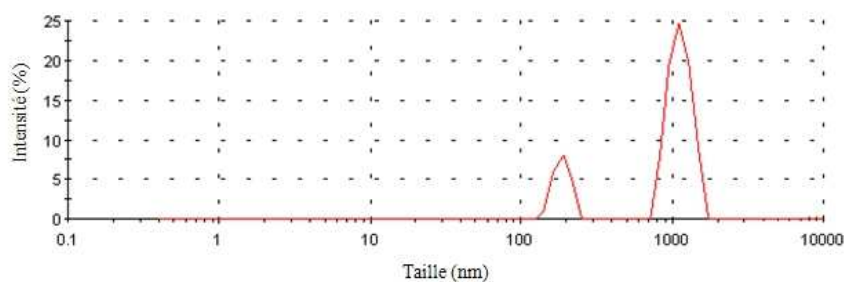
pH=3.5



*Figure 72: Dispersion de disperal à pH= 3,5 (distribution en intensité)*

Nous observons une distribution bimodale pour la solution à pH 3,5. Il y a un pic à 105nm et à 458nm.

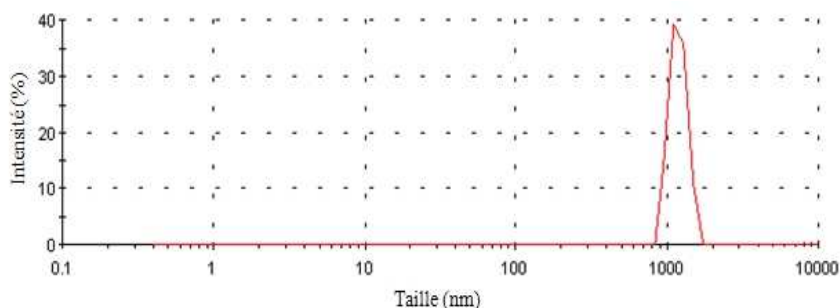
pH=6.9



**Figure 73: Dispersion de dispersal à pH= 6,9 (distribution en intensité)**

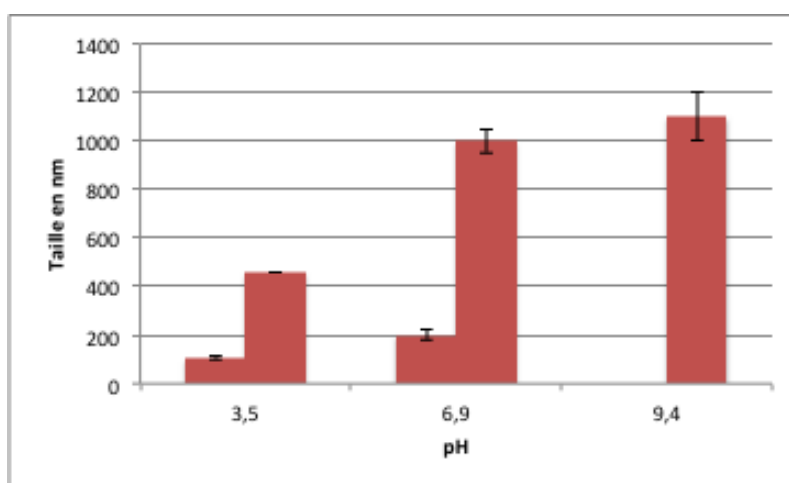
Pour les résultats obtenus à pH 6,9 nous observons une distribution bimodale avec un pic à 200 nm et un autre vers 1  $\mu\text{m}$ .

pH=9.4



**Figure 74: Dispersion de dispersal à pH= 9,4 (distribution en intensité)**

A pH 9,4, nous observons une distribution monomodale avec un pic de distribution à 1,1 $\mu\text{m}$ . Les différents résultats nous permettent de tracer la Figure 75 représentant la taille des particules de dispersal en fonction du pH.



**Figure 75: Taille des particules de dispersal en fonction du pH dans l'eau**

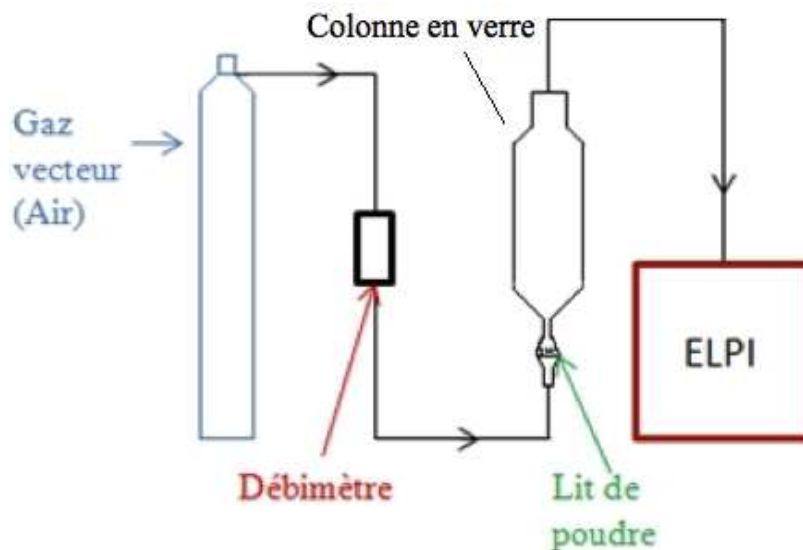


Les résultats de spectroscopie de corrélation de photons montrent que la taille des particules varie en fonction du pH. En effet la taille est plus faible à pH acide (105 nm) et plus élevée à pH neutre (200 nm) et basique (1,1  $\mu\text{m}$ ). Les particules ont donc fortement tendance à s'agglomérer lorsque le pH augmente.

Les mesures de potentiel zêta réalisées précédemment ont montré qu'à pH 7, le potentiel zêta est supérieur à 30mV dans l'eau, les particules sont donc fortement chargées et ont tendance à se repousser, la solution est donc stable. Au contraire à pH 9 les particules ne sont que très peu chargées et auront donc à l'inverse tendance à s'agglomérer ce qui confirme donc les résultats obtenus quant à l'agglomération des particules en fonction du pH.

### III.1.4. Fraction aérosolisée

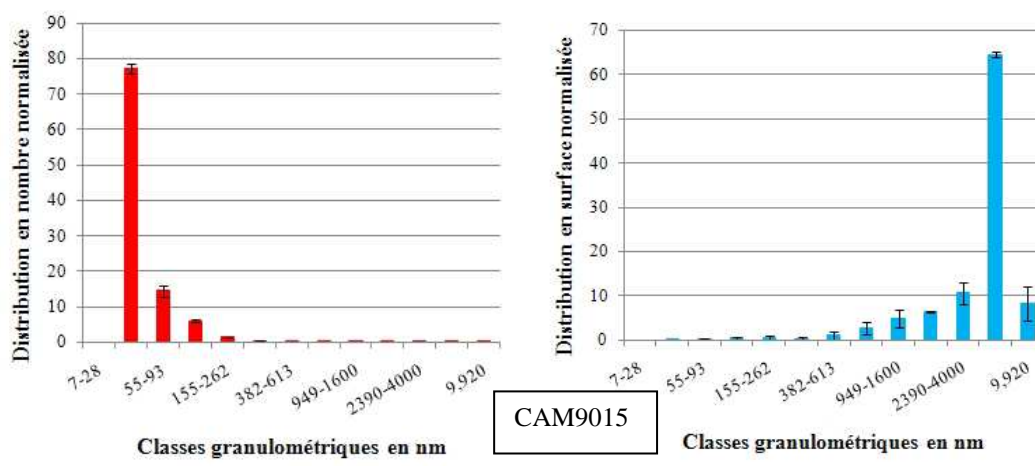
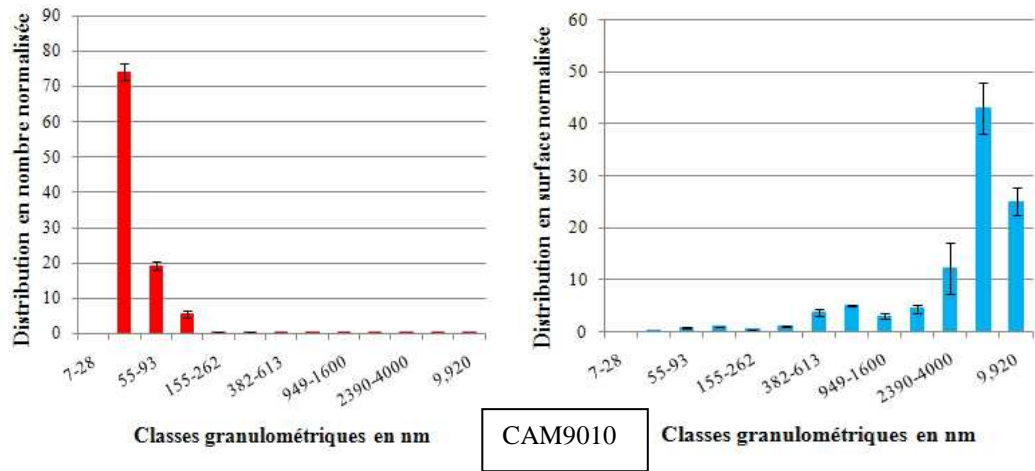
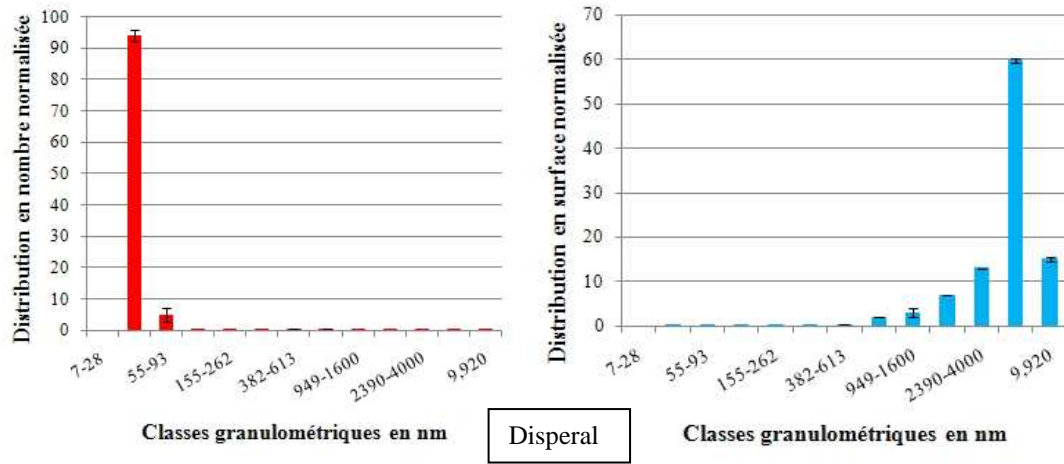
Les particules de boehmite possèdent une gamme large et variable de la granulométrie entre les diverses particules en suspensions. L'ELPI va permettre de déterminer en temps réel la distribution de taille de l'aérosol créé, dans une gamme comprise entre 27 nm et 10  $\mu\text{m}$ . Nous avons donc mis en place un dispositif permettant de créer un aérosol que l'on peut alors analyser grâce à l'impacteur en cascade. Le schéma de l'installation est représenté ci dessous.

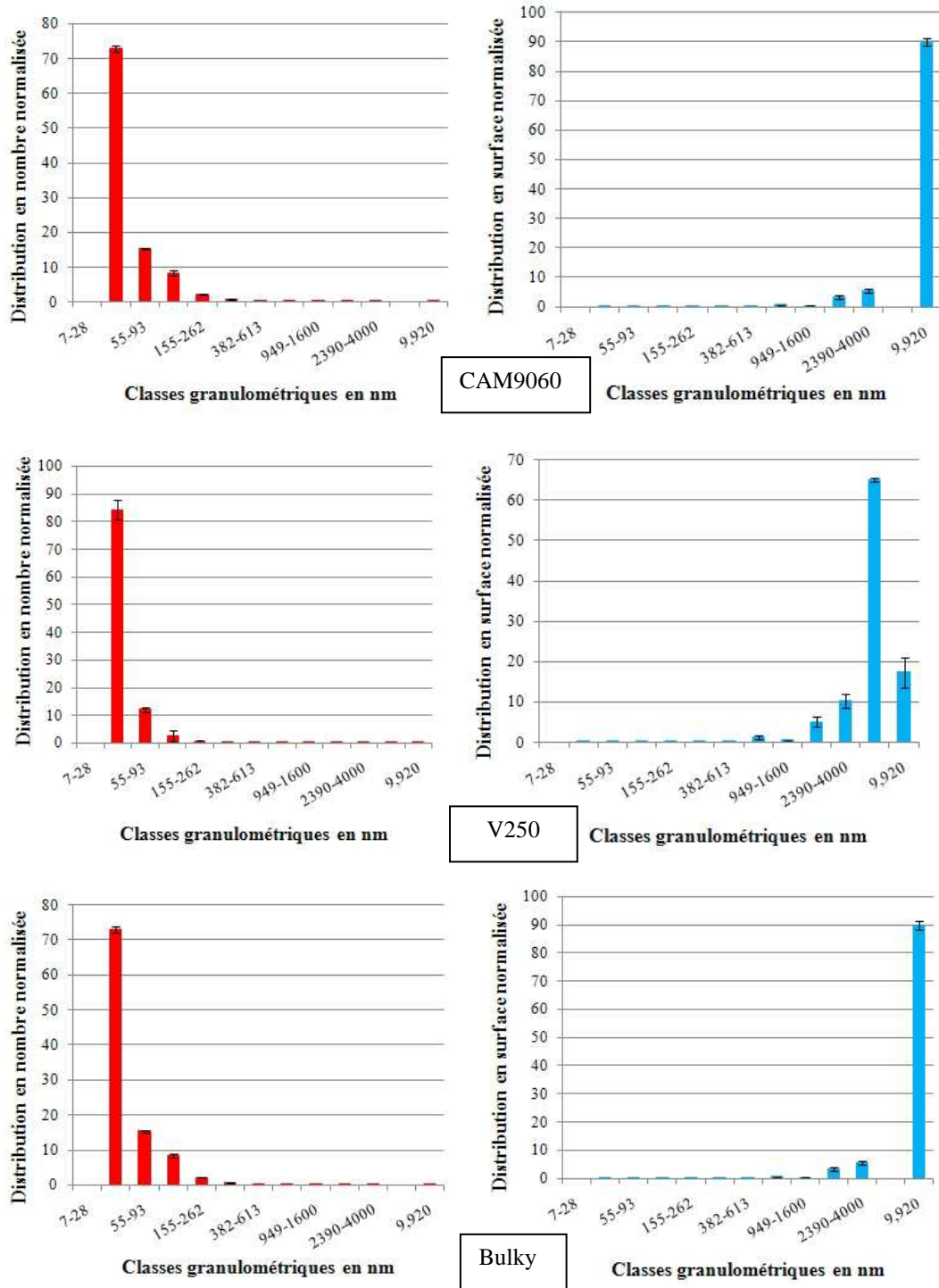


*Figure 76: Schéma du dispositif pour mesures avec l'impacteur en cascade*

Nous disposons un lit de particules de 10 mg (poudres brutes) en bas d'une colonne, l'aspiration de l'ELPI (10L.min<sup>-1</sup>) ainsi que le gaz vecteur au même débit permettent de créer un aérosol. L'impacteur en cascade mesure ensuite les différentes tailles de particules formant l'aérosol. Les résultats pour les différentes poudres de boehmite sont représentés ci-dessous.

Nous avons tracé la distribution en nombre normalisée et la distribution en surface normalisée en fonction des différentes classes granulométriques.





**Figure 77: Distribution normalisée en nombre et en surface de particules pour les différentes classes granulométriques**

Pour les résultats en nombre nous pouvons voir des similarités pour les différentes particules de boehmite avec une répartition des différents types de particules sur les plus petites classes. Pour la totalité des particules il y a plus de 70% des particules qui ont une taille comprise entre 28 et 55 nm d'où l'intérêt de l'étude de la toxicité par voie inhalée de ces particules. Les particules de disperal possèdent plus de 90% de particules comprises en 28 et

55 nm. Lorsque nous comparons avec les résultats obtenus en surface, les proportions comprises sur les plus petits plateaux disparaissent au profit des plus gros. En effet le peu de particules mesurées de grandes tailles ( $>10\mu\text{m}$ , impactées sur le premier plateau) l'emporte lorsque les résultats sont tracés en surface et en masse (non montrés).

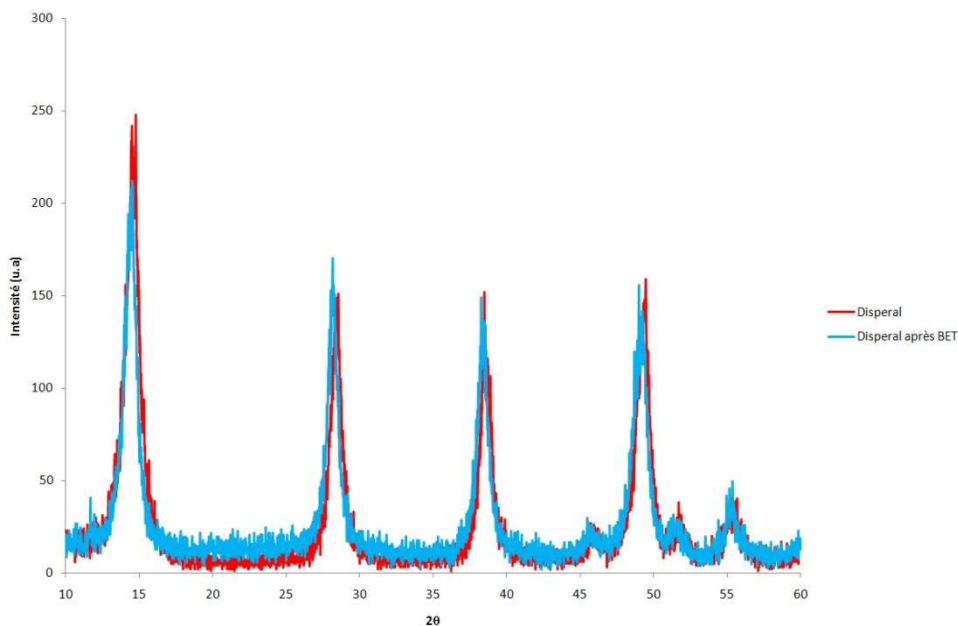
Il y a donc deux grands groupes qui se dégagent. Les particules de disperal, CAM9010, CAM 9015 et V250 montrent des particules plus fines lorsque nous regardons les résultats représentés en fonction de la surface. Quant aux particules de CAM9060 et bulky elles possèdent des particules de tailles plus grosses avec essentiellement des particules supérieures à  $10\mu\text{m}$ .

Ces résultats sont assez cohérents avec ceux obtenus après la spectroscopie de corrélation de photons notamment pour la bulky qui se distingue des autres types de particules par sa taille.

### III.1.5. Surface spécifique

La surface spécifique a été déterminée grâce à l'appareillage ASAP 2000 de la société Micromeritics, après 2h de dégazage à  $150^\circ\text{C}$ .

La poudre récupérée après mesure de BET a été analysée par DRX afin de montrer que celle-ci était toujours sous la forme boehmite et non modifiée en alumine de transition Figure 78.



*Figure 78: Diffractogramme de rayons X des particules de disperal avant et après BET*

Sur l'hypothèse que les particules sont considérées comme étant des sphères non poreuses, il est possible d'obtenir la taille des particules primaires à partir des valeurs de surface BET et de masse volumique :

$$d_{pp} = \frac{6}{\rho_{pp} \times S_{BET}}$$

*Équation III-1*

$D_{pp}$  : diamètre des particules primaires

$\rho_{pp}$  : masse volumique

$S_{BET}$  : surface spécifique

La masse volumique théorique de la boehmite est de  $3,01\text{g.cm}^{-3}$ , les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

Echantillons	Surface spécifique ( $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ )	Diamètre des particules primaires en nm
<b>Disperal</b>	157,12±0.59	12,70
<b>CAM 9010</b>	108,87±0.22	18,31
<b>CAM 9015</b>	102,05±0.0949	19,53
<b>CAM9060</b>	120,53±0.64	16,54
<b>V250</b>	257,45±1.13	7,74
<b>Bulky</b>	20,71±0.54	96,25

*Tableau 10: Surface spécifique et taille des particules primaires*

Les différentes particules présentent des surfaces spécifiques assez élevées (entre 100 et  $250\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ ) et donc des diamètres de particules primaires très faible (de 7 à 20 nm). Au contraire, les particules de bulky présentent des particules primaires beaucoup plus grossières (100 nm) avec une surface spécifique de  $20,7\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ .

Les particules peuvent donc être classées en deux catégories. Il y a les particules dont la taille des particules primaires est inférieure à 20nm (Disperal, CAM et V250) et les particules

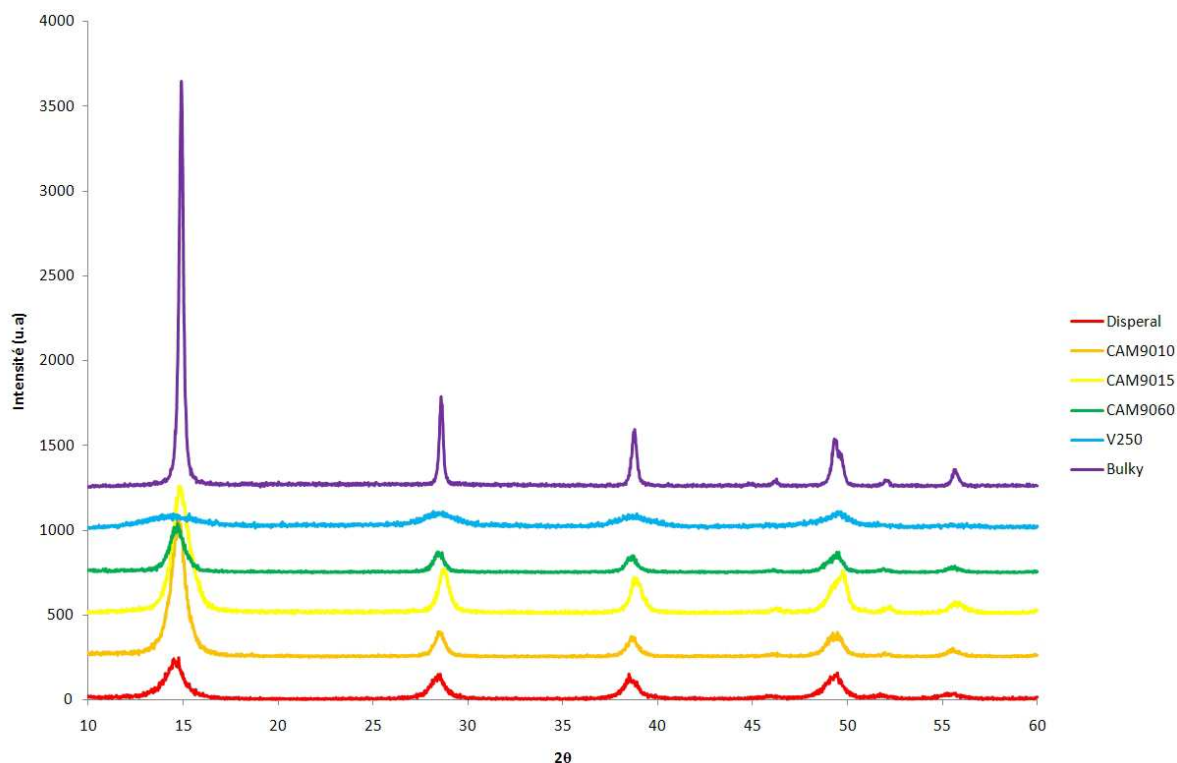
à la frontière des nanoparticules comme les particules de bulky qui possèdent une taille des particules primaires de 96nm.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment et notamment la poudre de bulky qui se différencie des autres par sa taille.

La spectroscopie de corrélation de photons n'a pas montré la présence de ces particules primaire nanométrique en solution, nous les retrouvons surtout sous forme d'agglomérats nanométrique ou submicronique.

### III.1.6. Structure cristalline

L'étude de la structure cristallographique permet d'obtenir des informations sur la nature des particules étudiées (pureté).



*Figure 79: Diffractogramme de rayons X des particules de boehmite*

La Figure 79 représente les diffractogrammes obtenus pour des échantillons de boehmite. Tous les pics obtenus sont caractéristiques de la boehmite (fiche JCPDS), il n'y a pas de pics supplémentaires relatifs à des impuretés résiduelles.

Nous pouvons constater aussi que les particules de V250 sont moins bien cristallisées que les autres.

Par la méthode Debye Scherrer il est possible de déterminer la taille des cristallites. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau 11):

Echantillons	Taille des cristallites (nm)	Diamètre des particules primaires en nm méthode BET
<b>Disperal</b>	10,0	12,70
<b>CAM9010</b>	13,2	18,31
<b>CAM9015</b>	11,9	19,53
<b>CAM9060</b>	14,1	16,54
<b>V250</b>	4,3	7,74
<b>Bulky</b>	54,6	96,25

*Tableau 11: Tailles de cristallites déterminées par la méthode Debye Scherrer*

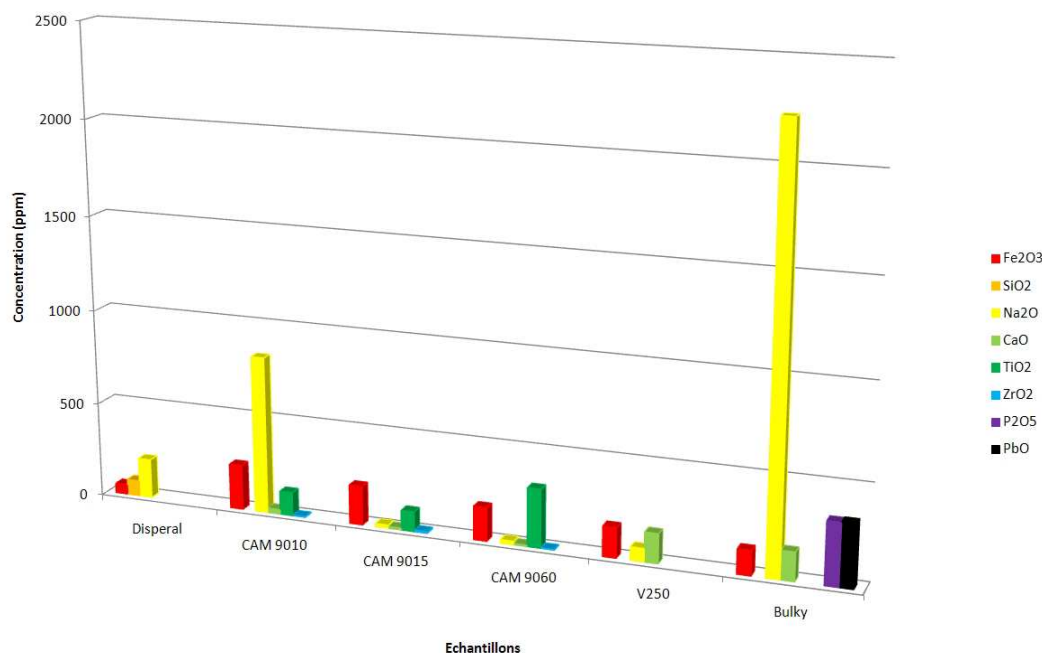
Les résultats obtenus par le biais de cette méthode sont en accord avec ceux obtenus par le calcul du diamètre de particules primaires avec la surface spécifique et la masse volumique. Les différentes particules ont des tailles de cristallites du même ordre de grandeur (dizaine de nm) hormis les particules de V250 dont les cristallites ont une taille inférieure à 5 nm et les particules de bulky qui possèdent des cristallites ayant une taille bien supérieure aux autres particules (55 nm).

Nous retrouvons de la même manière que précédemment deux groupes. Les particules de disperal, de CAM et de V250 possèdent des tailles de cristallites comprises entre 4 et 14 nm. Le deuxième groupe est composé des particules de bulky qui se démarquent par leur taille supérieure aux autres. Elles possèdent d'après la méthode Debye-Scherrer une taille de cristallites de 55nm.

### **III.1.7. Analyse chimique et de surface des nanopoudres de boehmite**

#### **III.1.7.1. Analyse chimique**

Les résultats de l'analyse chimique par ICP recensent les impuretés présentes dans les échantillons.



**Figure 80: Concentration des impuretés des particules de boehmite industrielles exprimée en équivalent d'oxyde**

Nous constatons la présence de fer dans chacun des échantillons mais en quantité très faible. Le fer est connu pour jouer un rôle important dans l'activité biologique des poudres en participant au stress oxydant ou en entraînant la réaction de Fenton (cf. I.1.5.3). En effet le fer agit vraisemblablement via des mécanismes de réactions en chaînes (Bice Fubini & Andrea Hubbard 2003g). Elles entraînent la formation de « réactifs de Fenton » qui constitue un puissant oxydant. Il est difficile de conclure à un mécanisme réactionnel unique car il y a probablement d'autres paramètres impliqués (morphologie, structure cristalline, impuretés...)

Nous constatons aussi la présence d'autres oxydes métalliques mais toujours en quantité limitée tel que le silicium, le sodium, le calcium, le titane, le zirconium, le phosphate. Les particules de bulky se différencient par la présence en grande quantité de sodium mais aussi par la présence de plomb qui peut avoir un impact sur l'activité biologique des particules (Garnier 2005).

### III.1.7.2. Analyse de surface

L'analyse de surface par XPS est utilisée pour mettre en évidence des différences au niveau de la composition de surface entre les divers échantillons. Les pics  $Al_{2p}$ ,  $O_{1s}$ ,  $C_{1s}$ ,  $Si_{2p}$ , ont été détectés sur une zone d'énergie de liaison ( $E_l$ ) allant de 0 à 900 eV.



Des impuretés, principalement de carbone libre (C), et de silicium peuvent être présentes en surface de ces mêmes grains. Compte tenu du libre parcours moyen des électrons dans le matériau, les analyses s'effectuent sur une épaisseur de quelques nanomètres (0,5 à 5 nm) à partir de la surface du matériau.

Le pourcentage atomique a été résumé dans le Tableau 12.

Pourcentage atomique	Nom des échantillons					
	Disperal	CAM9010	CAM9015	CAM9060	V250	Bulky
O 1s	56,22	58,94	59,53	57,58	59,99	60,05
Al 2p	38,67	37,16	38,72	39,62	36,75	39,95
Si 2p	2,62	2,22	1,75	2,55	3,33	/
C 1s	2,5	1,68	/	0,24	/	/
Ratio Al/O	0,68	0,63	0,65	0,69	0,61	0,67

*Tableau 12: Composition chimique des particules de boehmite*

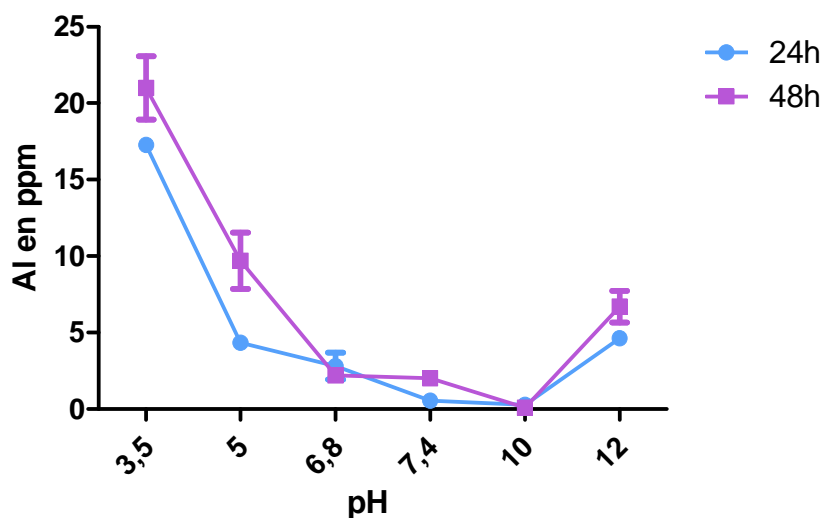
La formule chimique de la boehmite est  $\text{AlOOH}$  lorsqu'elle est pure. Le rapport atomique Al/O est ainsi de 0,5 (Klopprogge et al. 2006). Les différents échantillons montrent des rapports supérieurs à ce qui est attendu. En effet nous observons des rapports compris entre 0,61 et 0,69. Ces résultats ressemblent plus à un résultat attendu pour  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (ration Al/O = 0,66), nos particules présentent en effet plus d'oxygène qu'attendu. Ceci peut être dû à la présence d'alumine amorphe et anhydre en surface.

### III.1.8. Solubilité

Afin de déterminer la solubilité de la boehmite (disperal), nous avons réalisé une suspension de boehmite dans l'eau ultrapure mQ (Millipore) dans un erlenmeyer. Cette suspension a été préparée de façon à être représentative des concentrations utilisées lors des tests biologiques (6mg de boehmite/50mL d'eau). Plusieurs suspensions ont été préparées à différents pH.

Cette analyse a été réalisée aux temps 24 et 48h au cours desquelles les suspensions sont restées sous agitation. Chaque mesure a été réalisée en triplicate. Durant le temps choisi les suspensions ont été agitées. Ensuite le surnageant est centrifugé de façon à éliminer les

nanoparticules puis l'aluminium est dosé par ICP. Un témoin d'eau seule a été réalisé à chaque échantillon pour connaître la quantité d'aluminium initiale dans l'eau utilisée. Les résultats obtenus sont représentés dans le graphique ci-dessous.



*Figure 81: Solubilité de l'aluminium dans l'eau*

Nous observons une allure de courbe similaire pour les différents temps utilisés montrant une faible quantité d'aluminium en solution entre pH 6 et pH 10 (Figure 81). En effet dans cette zone, la quantité d'aluminium mesurée dans le surnageant est très faible voire nulle. Le pH du milieu de culture utilisé lors des tests biologiques est de 7,4, nous pouvons donc conclure de ceci que lors de nos tests biologiques seulement 1ppm d'aluminium est dissous.

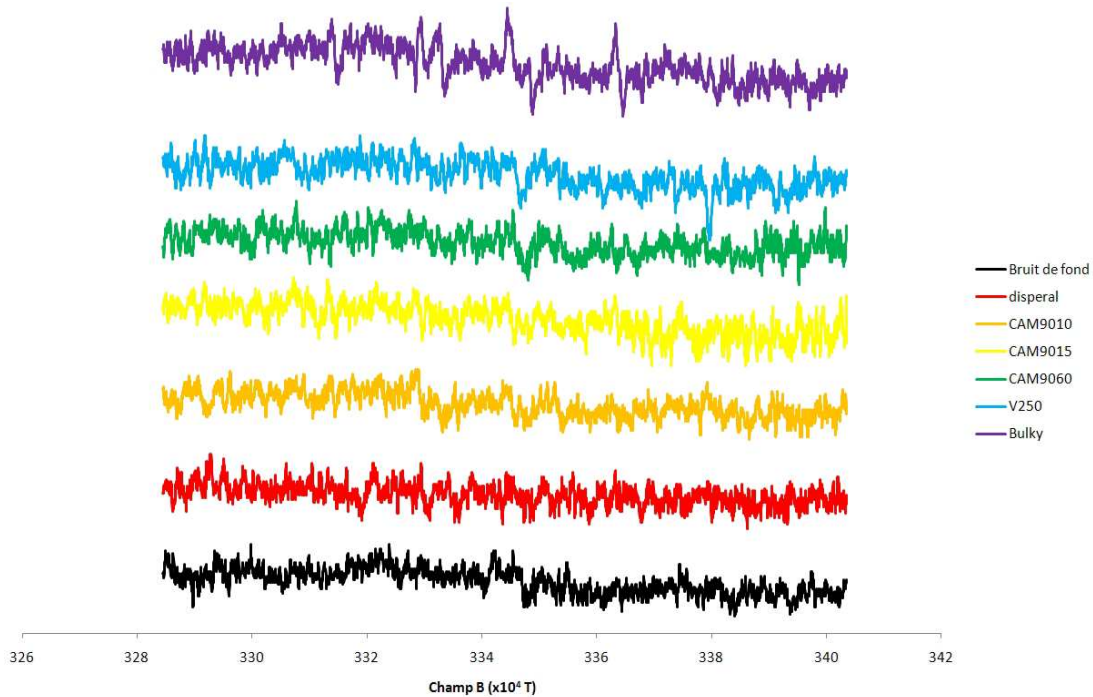
La dissolution de l'aluminium est plus importante pour des pH plus faible ou plus élevé.

L'étude de la solubilité de la boehmite dans nos travaux permet de conforter le fait que lors des tests biologiques nous mesurons bien l'effet de la boehmite sur les cellules et non l'effet des ions aluminium.

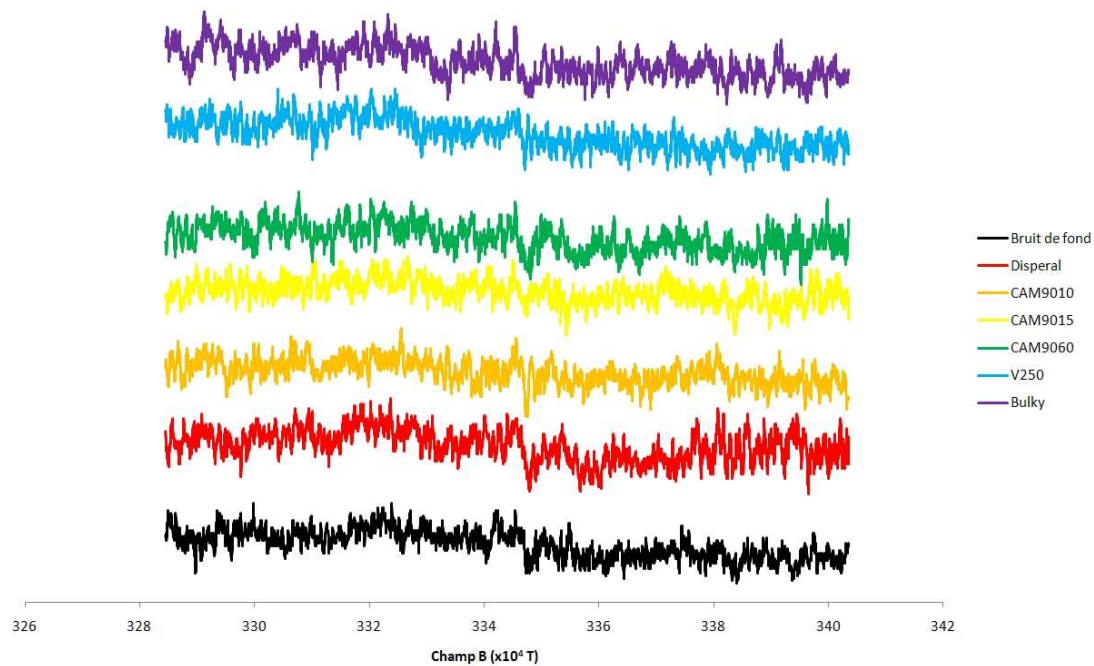
### **III.1.9. Résonance Paramagnétique Electronique**

Ces expériences de résonance paramagnétique électronique en milieu acellulaire permettent de mettre en évidence la capacité des particules de boehmite à participer à la génération de radicaux libres ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ). Elle permet de connaître la capacité des particules de boehmite à réagir avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour former des radicaux  $\text{HO}\cdot$  et avec les groupements C-H (communs à de nombreuses molécules présentes dans le milieu biologique) pour entraîner la formation du radical  $\text{COO}\cdot^-$ .

Les résultats obtenus soulignent une incapacité pour l'ensemble des particules industrielles à générer des radicaux libres  $\text{HO}\cdot$  (Figure 82) et  $\text{COO}\cdot^-$  (Figure 83).



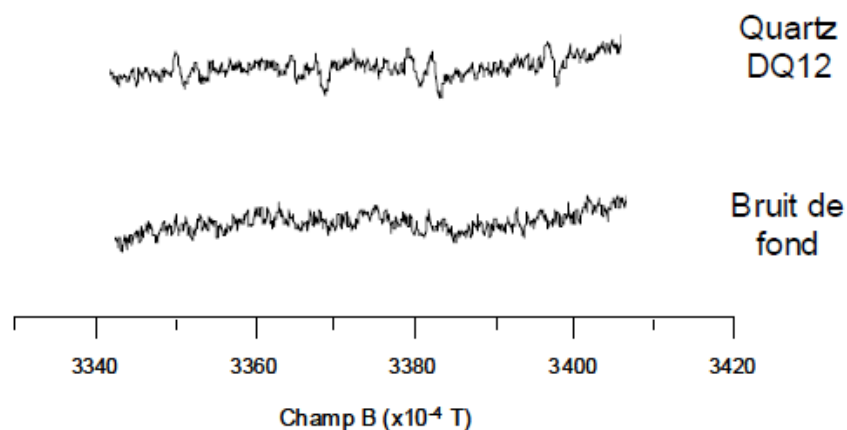
**Figure 82 :** Signaux RPE de l'adduit  $[\text{DMPO-OH}]\cdot$  obtenus en présence des particules industrielles de boehmite. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres  $\text{HO}\cdot$  générés



**Figure 83 :** Signaux RPE de l'adduit  $[\text{DMPO-COO}^-]\cdot$  obtenus en présence des particules industrielles de boehmite. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres  $\text{COO}\cdot^-$

Pour les deux tests, les signaux relatifs aux particules industrielles sont à peine détectables et très proche du signal du bruit de fond. Les particules de boehmite n'entraînent donc aucune activité radicalaire significative ( $\text{HO}\cdot$  et  $\text{COO}\cdot^-$ ).

De précédents travaux montrent l'absence d'activité radicalaire pour le témoin positif de toxicité (quartz DQ12) (Bouhmadi 2009).



*Figure 84 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-OH]• obtenus en présence de quartz DQ12. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres  $\text{HO}\cdot$  générés (Bouhmadi 2009)*

Lorsque les signaux sont significativement différents du bruit de fond, il est possible par le biais d'un étalon interne de référence (Manganèse) de concentration connue, mesuré dans les mêmes conditions environnementales, d'accéder à la quantité de radicaux générés.

### **III.1.10. Conclusion intermédiaire**

Cette partie a permis de déterminer les principales caractéristiques physico-chimiques (taille, surface, morphologie, chimie, structure cristalline, état de surface, activité radicalaire) des particules industrielles.

En résumé, les particules industrielles de boehmite possèdent des morphologies différentes. Les particules de disperal et de V250 sont sphériques, les différentes CAM sont sous forme de plaquettes et les particules de bulky sous forme de feuillets.

Nous avons vu que les particules étudiées peuvent s'agglomérer dans l'eau ou le milieu de culture, cependant la granulométrie par diffraction laser ainsi que la spectroscopie de corrélation de photons nous permet de classer les particules en termes de tailles selon trois groupes :

- les particules non fortement agglomérées (<200nm): CAM 9010, CAM 9015, CAM 9060 et V250
- les particules fortement agglomérées en agglomérats submicroniques (entre 200 et 1000nm) et en agglomérats microniques (>1000nm) : disperal
- les très gros agglomérats microniques (>1000nm): bulky

Elles possèdent des surfaces spécifiques importantes et ont donc des tailles de particules primaires assez petites, inférieures à 20nm pour les particules de disperal, de CAM et de V250 et approchant les 100nm pour les particules de bulky. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par diffractométrie des rayons X.

Ces particules de boehmite peuvent présenter des traces d'impuretés métalliques (Fe, Si, Na...). Le silicium est retrouvé en surface. Les particules de bulky se distinguent une nouvelle fois par la présence importante de sodium et du plomb qui n'apparaît pas pour les autres particules

		Echantillons					
		Disperal	CAM9010	CAM9015	CAM9060	V250	Bulky
Caractérisations physicochimiques	D <sub>50</sub> en µm (granulométrie laser)	17,29	4,54	0,39	1,75	124,60	5,20
	Diamètre des populations en nm Eau (PCS)	185,9 1125	202,8	74,3	19,3 133,6	45	2201
	Diamètre des populations en nm Milieu de culture (PCS)	15,36 459,9	174,4	14,67 255,1	6,95 20,69 147,5	13,93 50,73 4833	1393
	Surface spécifique en m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	157,12	108,87	102,05	120,53	257,45	20,71
	Dpp en nm	12,70	18,31	19,53	16,54	7,74	96,25
	Taille des cristallites en nm	10,0	13,2	11,9	14,1	4,3	54,6
	Point isoélectrique	9,4	9,24	9,60	8,95	8,85	8,26
	ξ <sub>eau</sub> en mV	35,2	27,3	42,7	28,0	15,4	9,5
	ξ <sub>DMEMc</sub> en mV	-10,1	-11	-12,2	-9,48	-10,5	-12
	Impuretés ICP en ppm	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :51; SiO <sub>2</sub> :81; Na <sub>2</sub> O:206	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :237; Na <sub>2</sub> O:828; Traces de CaO; TiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : 205; TiO <sub>2</sub> :105; Traces de Na <sub>2</sub> O; CaO; ZrO <sub>2</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : 176; ZrO <sub>2</sub> : 308; Traces de Na <sub>2</sub> O; CaO; TiO <sub>2</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : 159; CaO: 155; Traces de Na <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O: 2230; PbO:329; P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> :326;Traces deFe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ;CaO

**Tableau 13: Récapitulatif des données physicochimiques des différentes particules industrielles de boehmite fournies par notre partenaire industriel**



## III.2. Posts-Traitements appliqués aux particules industrielles

Dans cette partie nous présenterons les résultats relatifs aux particules auxquelles nous avons soumis des traitements de broyage ou d'impaction en cascade.

L'objectif de ces traitements est d'éliminer les plus grosses particules mais aussi d'utiliser une poudre micrométrique et de la rendre nanométrique afin de comparer l'activité biologique selon les paramètres définis (cf. Chapitre II).

### III.2.1. Récupération de la fraction fine

Les particules industrielles de boehmite possèdent des distributions granulométriques assez larges. Par conséquent, la première étape consiste à éliminer les plus grosses particules pour ne garder que la fraction fine.

Nous avons donc mis au point un dispositif expérimental permettant grâce à l'impacteur en cascade de récupérer les fractions fines. Afin de faire une première sélection et de ne pas encombrer l'impacteur de grosses particules nous avons placé un cyclone ayant un seuil de coupure de 800nm pour un débit de 10L /min<sup>-1</sup>.

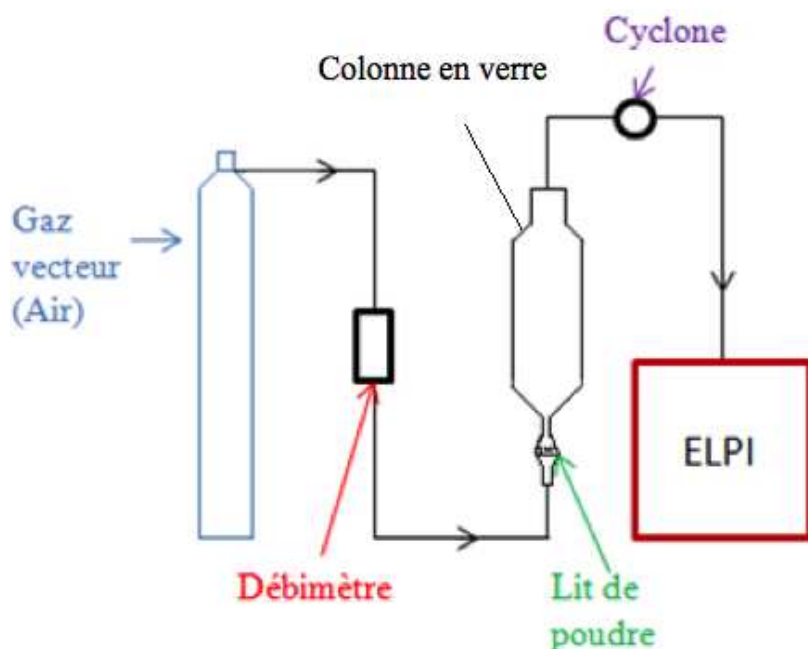
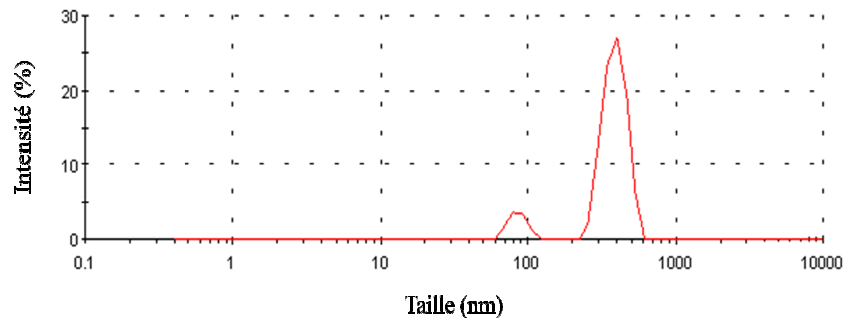


Figure 85: Montage de récupération de la fraction fine des particules de boehmite



Les particules sont fluidisées, puis sélectionnées dans un cyclone avant de pénétrer dans l'ELPI. Les particules sont alors récoltées sur les différents étages de l'impacteur. L'utilisation de l'ELPI permet à la fois de sélectionner la gamme de taille désirée mais aussi de vérifier que le cyclone élimine bien les plus grosses particules. Les particules s'appellent alors dispersal « dustiness ».

Nous avons réalisé des mesures de spectroscopie de corrélation de photons dans le but de vérifier la taille des particules obtenues.



**Figure 86: Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des particules de boehmite dispersal « dustiness »**

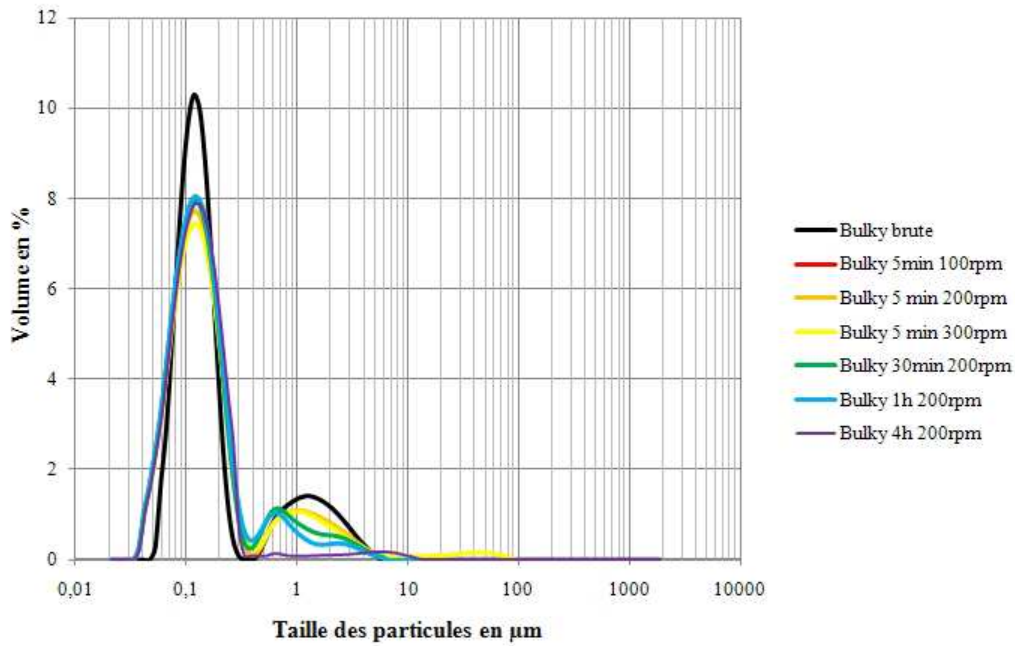
Les résultats montrent pour les particules de boehmite dispersal « dustiness » deux populations, une à 80 nm et une autre à 400 nm. Notre système a donc bien permis d'éliminer les particules supérieures à 800 nm.

### **III.2.2. Broyage**

Les particules de bulky possèdent un diamètre important, il n'est donc pas possible de récupérer la fraction fine de la même manière que précédemment, nous avons donc essayé de la broyer afin d'obtenir des particules plus fines.

Les broyages ont été réalisés avec un broyeur planétaire Retsch PM400. Les bols et billes de broyage utilisés sont en alumine. Différentes conditions de broyage ont été testées en modifiant la vitesse de rotation et/ou le temps de broyage dans le but d'obtenir des particules fines de bulky et donc de broyer les plus grosses particules.

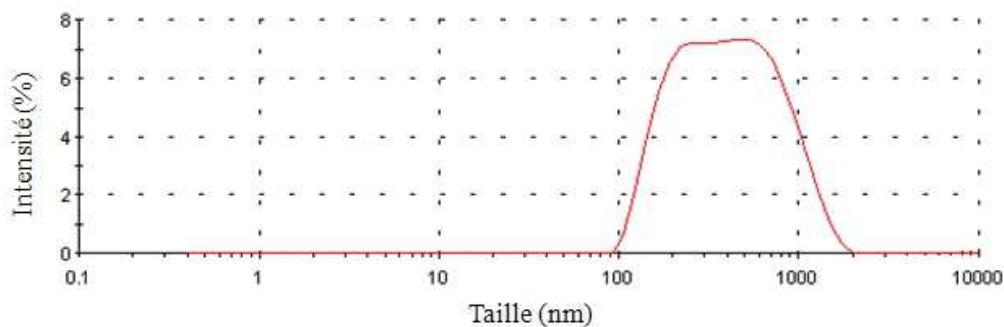
A la suite du broyage la taille des particules est déterminée par granulométrie laser.



**Figure 87 : Distribution en taille par granulométrie laser des particules de bulky avant et après différentes conditions de broyage**

Les distributions granulométriques montrent que plus le temps de broyage augmente, plus les grosses particules disparaissent au profit des plus petites. Nous avons sélectionné la poudre après 4h heures de broyage à 200 rpm.

La taille des particules de bulky après broyage s'étend de 100 à 2000nm d'après les résultats obtenus par spectroscopie de corrélation de photons. Les particules de bulky brute montraient une taille supérieure à 2200nm, nous avons donc bien par la méthode de broyage diminué la taille des particules.



**Figure 88: Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des particules de boehmite « bulky » broyée**

Dans la prochaine partie nous étudierons l'impact sur l'activité biologique de ces particules qui seront nommées bulky broyée.

### III.2.3. Données physico-chimiques des particules après traitements

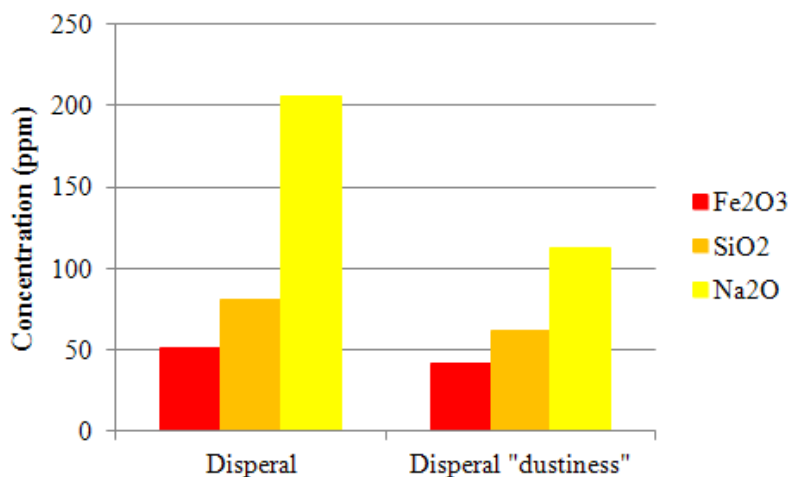
Dans le tableau suivant (Tableau 14) sont rassemblées les propriétés physico-chimiques des particules après traitement.

	<b>Disperal « dustiness »</b>	<b>Bulky broyée</b>
Diamètre des populations en nm Eau (PCS)	80 400	De 100 à 2000nm
Surface spécifique en m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	163,42	25,21
Dpp en nm	12,21	79,91
Impuretés ICP en ppm	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :41; SiO <sub>2</sub> : 62 ; Na <sub>2</sub> O :112	Pas d'impuretés supplémentaires dues au broyage

**Tableau 14 : Données physicochimiques des particules de disperal « dustiness » et de bulky broyée**

Les données physico-chimiques ne montrent pas de réelles différences entre les particules brutes et après traitement. En effet, les surfaces spécifiques obtenues sont très proches ce qui pouvaient être prévisibles car la taille des particules primaires n'a pas été modifiée.

En ce qui concerne les impuretés nous retrouvons pour les particules de disperal et de disperal « dustiness » des résultats proches mais tout de même légèrement inférieurs pour les particules après traitement. Le graphique suivant (Figure 89) nous permettra d'avoir une idée sur la quantité de chaque impureté.

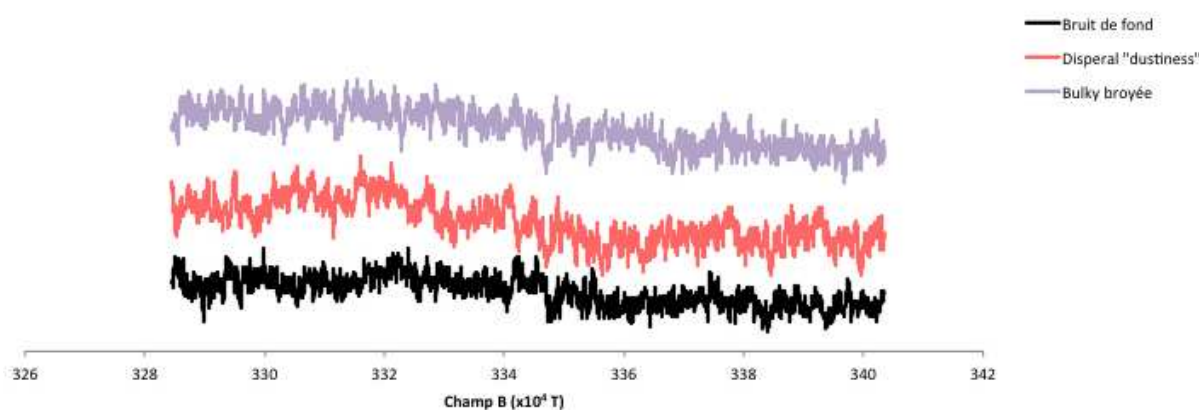


**Figure 89 : Concentration des impuretés des particules de disperal et disperal « dustiness » exprimée en équivalent oxyde**

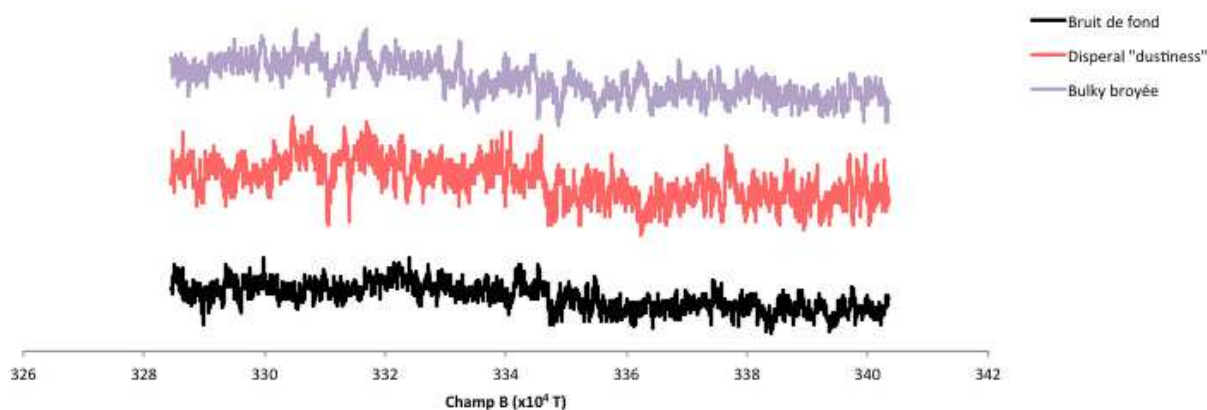
Si l'on compare les résultats quantitativement nous constatons une diminution de la quantité de toutes les impuretés. Les impuretés ne sont donc pas réparties de la même manière sur les particules, il y en a en effet plus d'impuretés dans les grosses particules que dans les petites. Ce changement reste tout de même limité.

Entre les particules de bulky et de bulky broyée, le fait de broyer ne peut pas modifier la composition chimique, de plus aucune impureté n'a été apportée par le broyage.

Les expériences de résonance paramagnétique ont été réalisées pour les particules de disperal dustiness et de bulky broyée. Les résultats soulignent une incapacité à générer des radicaux libres HO• (Figure 90) et COO• (Figure 91) de la même manière que pour les particules brutes.



**Figure 90 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-OH]• obtenus en présence des particules industrielles de boehmite. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres HO• générés**



**Figure 91 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-COO]• obtenus en présence des particules industrielles de boehmite. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres COO•**

Le traitement des particules a donc entraîné un changement de taille mais aussi pour les particules de disperal « dustiness » un léger changement d'un point de vue chimique avec des impuretés retrouvées en plus faible quantité, cependant la surface spécifique et la taille des cristallites sont restées identiques.

#### **III.2.4. Conclusion intermédiaire**

A l'aide de deux procédés nous avons obtenu des poudres possédant des particules de taille inférieure. En effet par élutriation nous obtenons une poudre, la disperal « dustiness » composée de particules de 400 et 80 nm alors qu'avant traitement cette même poudre possédait des particules d'environ 800nm.

Par le broyage nous avons pu, éliminer les grosses particules (>2000nm) afin d'en obtenir des plus petites comprises entre 100 et 2000nm.

Ces traitements n'ont pas eu d'influence sur la taille des particules primaires, mais ont modifié légèrement les propriétés chimiques dans le cas de la disperal « dustiness », en effet la quantité d'impureté retrouvée après traitement est plus faible.

### **III.3. Nanoparticules réalisées par synthèse hydrothermale à l'échelle du laboratoire**

Cette partiesera consacrée aux résultats de caractérisations physico-chimiques des nanoparticules élaborées par synthèse hydrothermale à l'échelle du laboratoire, l'intérêt étant de réaliser une étude comparative sur des particules de synthèse de même nature mais en faisant varier la taille. Les particules ont été synthétisées à l'école des mines de Paris.

De la même manière que pour les particules industrielles nous présenterons les résultats de granulométrie, de morphologie, de chimie, de structure cristalline selon les approches techniques présentées au Chapitre II. Nous possédons huit poudres différentes que nous numérotions de 1 à 8 pour les identifier.

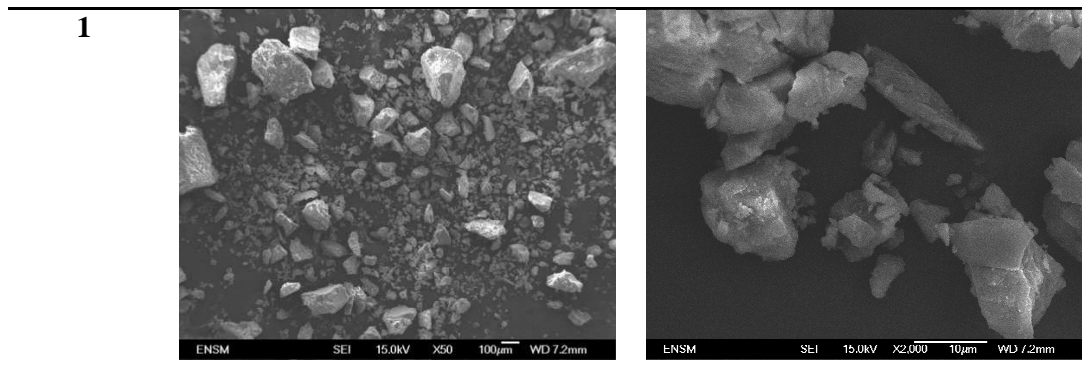
Les échantillons sont regroupés en 3 familles de cristallinité/taille croissante (I.2.2.4Synthèse hydrothermale de particules de boehmite).

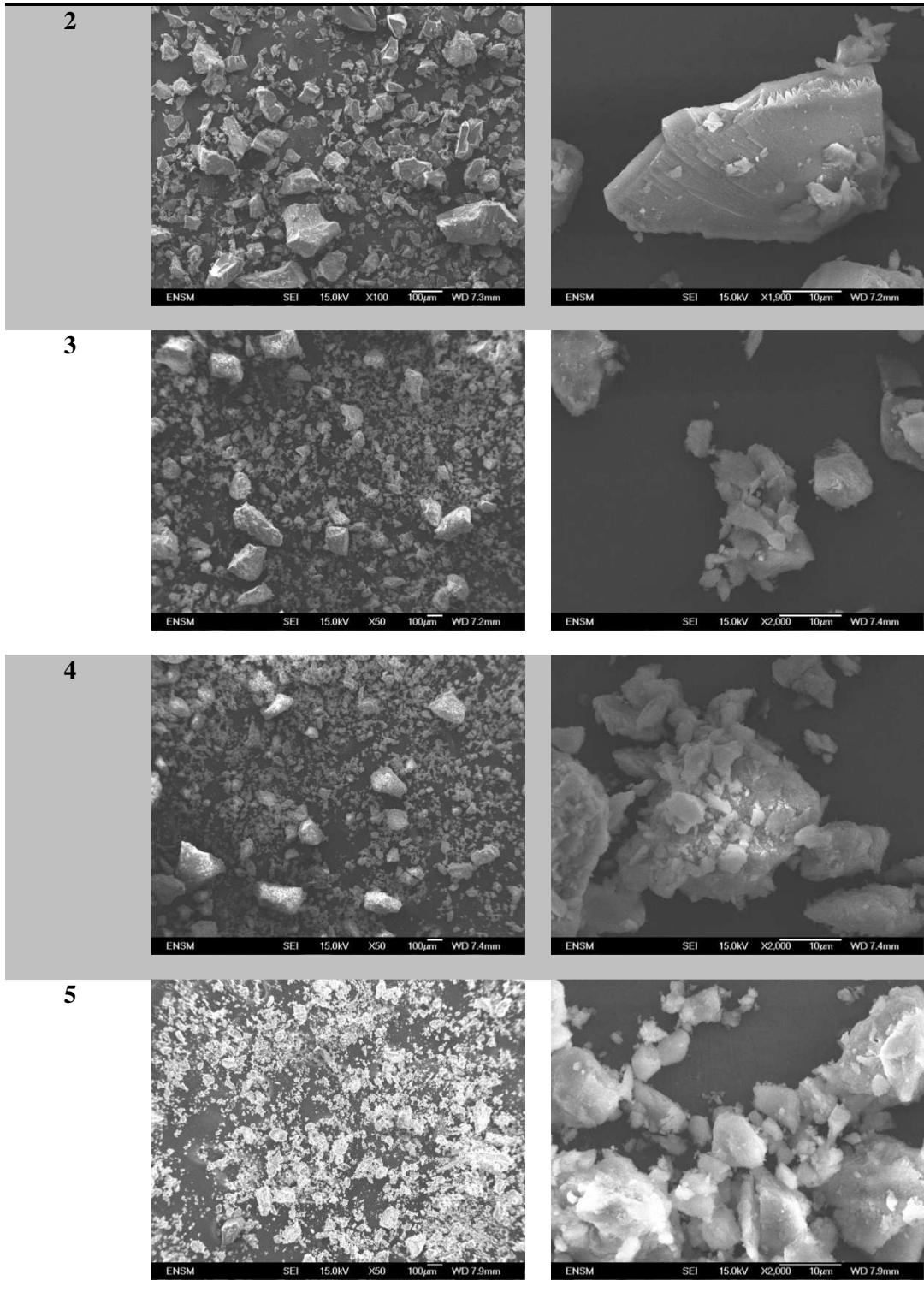
- Les échantillons 2, 3, 6 de faible cristallisation: mûrissement hydrothermal à 150°C.
- Les échantillons 1, 4, 8 de cristallisation "moyenne", obtenus à 180°C pendant des temps de cristallisation courts.
- Les échantillons 5 et 7 de forte cristallisation, obtenus à 180°C pendant des temps de cristallisation relativement longs.

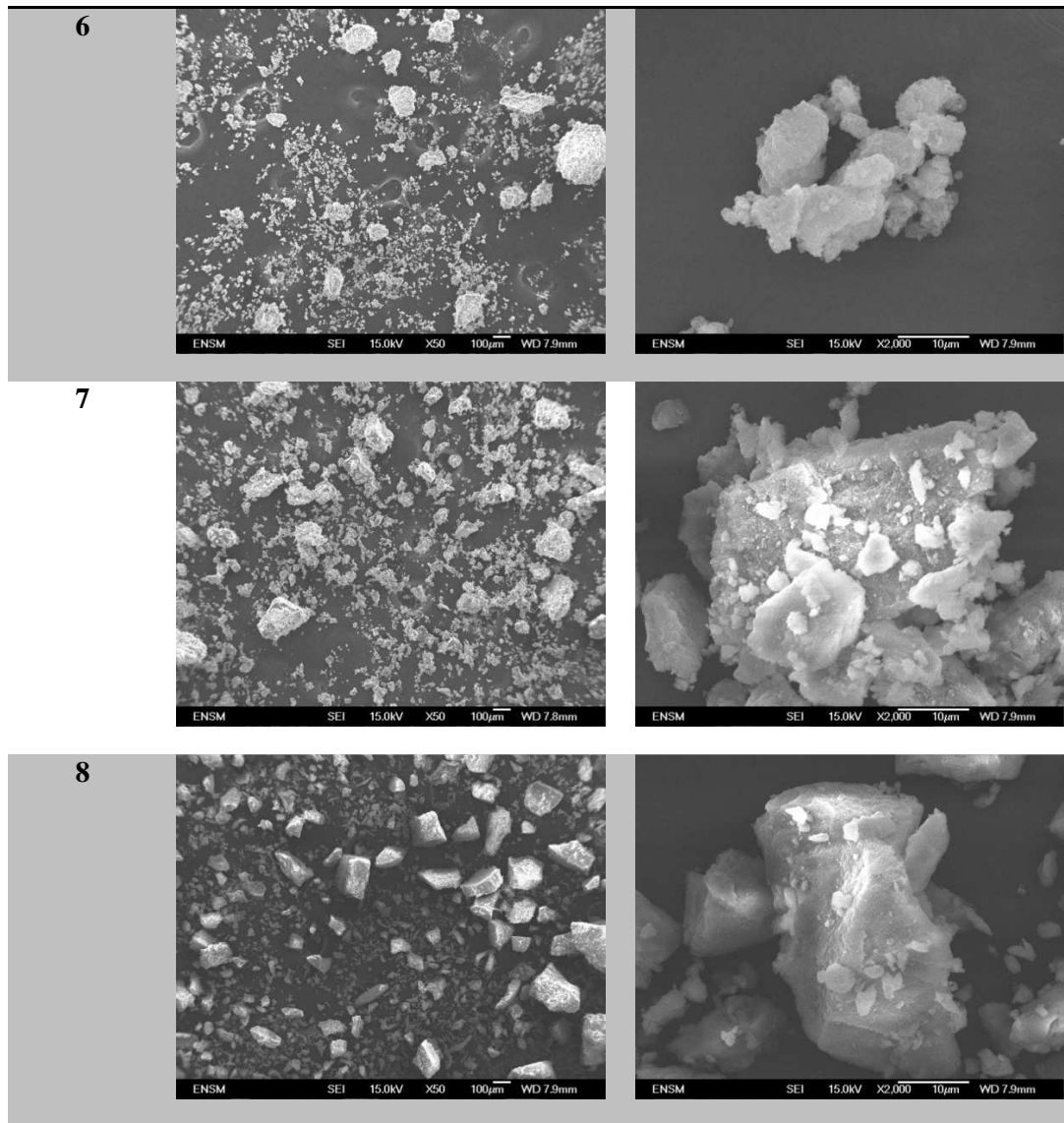
#### **III.3.1. Forme et granulométrie**

##### **III.3.1.1. Morphologie des particules**

Une analyse de la morphologie a été réalisée sur nos particules afin d'obtenir des informations sur la taille, la forme et l'aspect de surface des particules (microscopie électronique à balayage, granulométrie laser, spectroscopie de corrélation de photons).





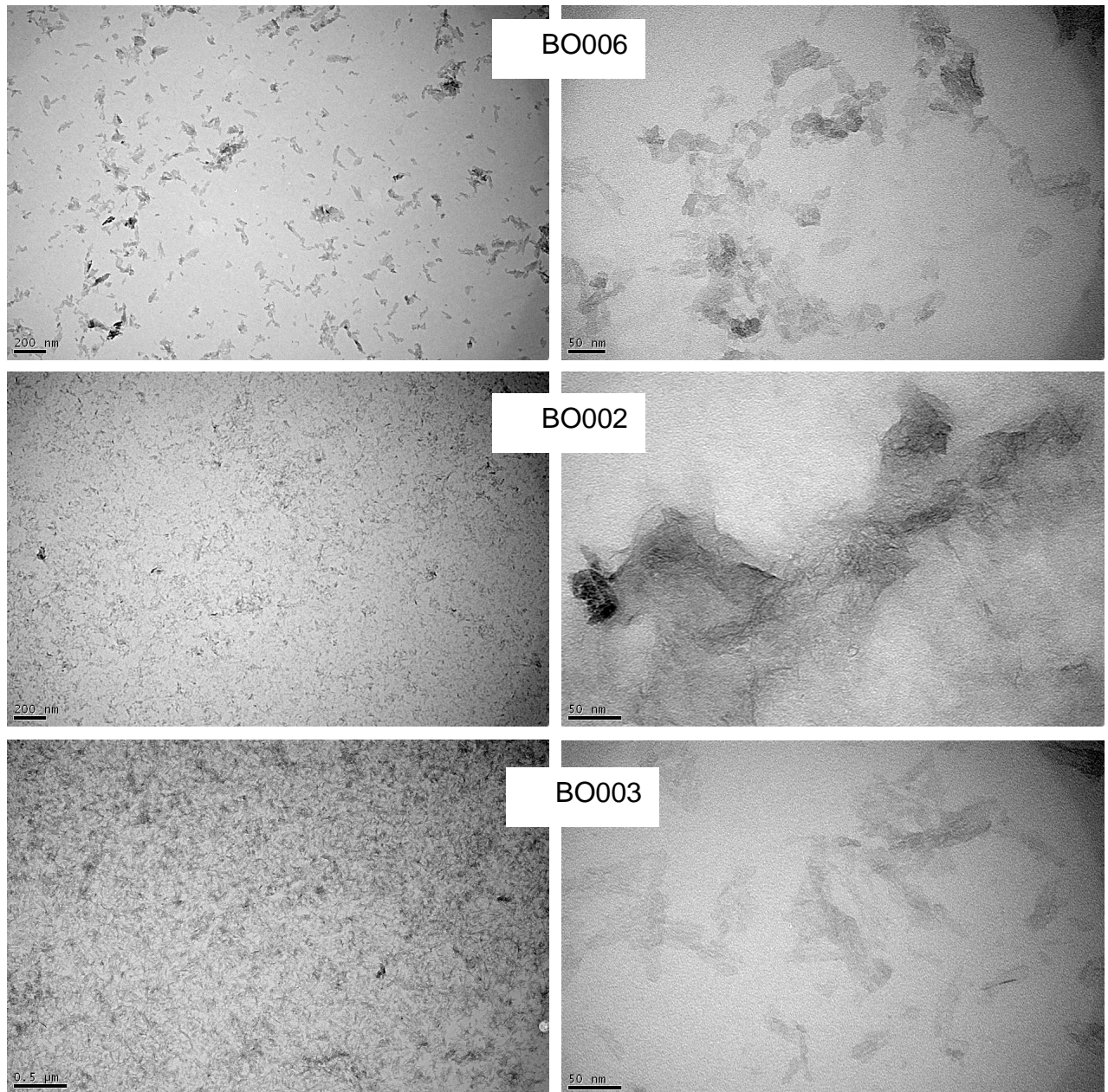


**Figure 92 : Observations microscopiques de poudres de boehmite synthétisées (MEB-FEG)**

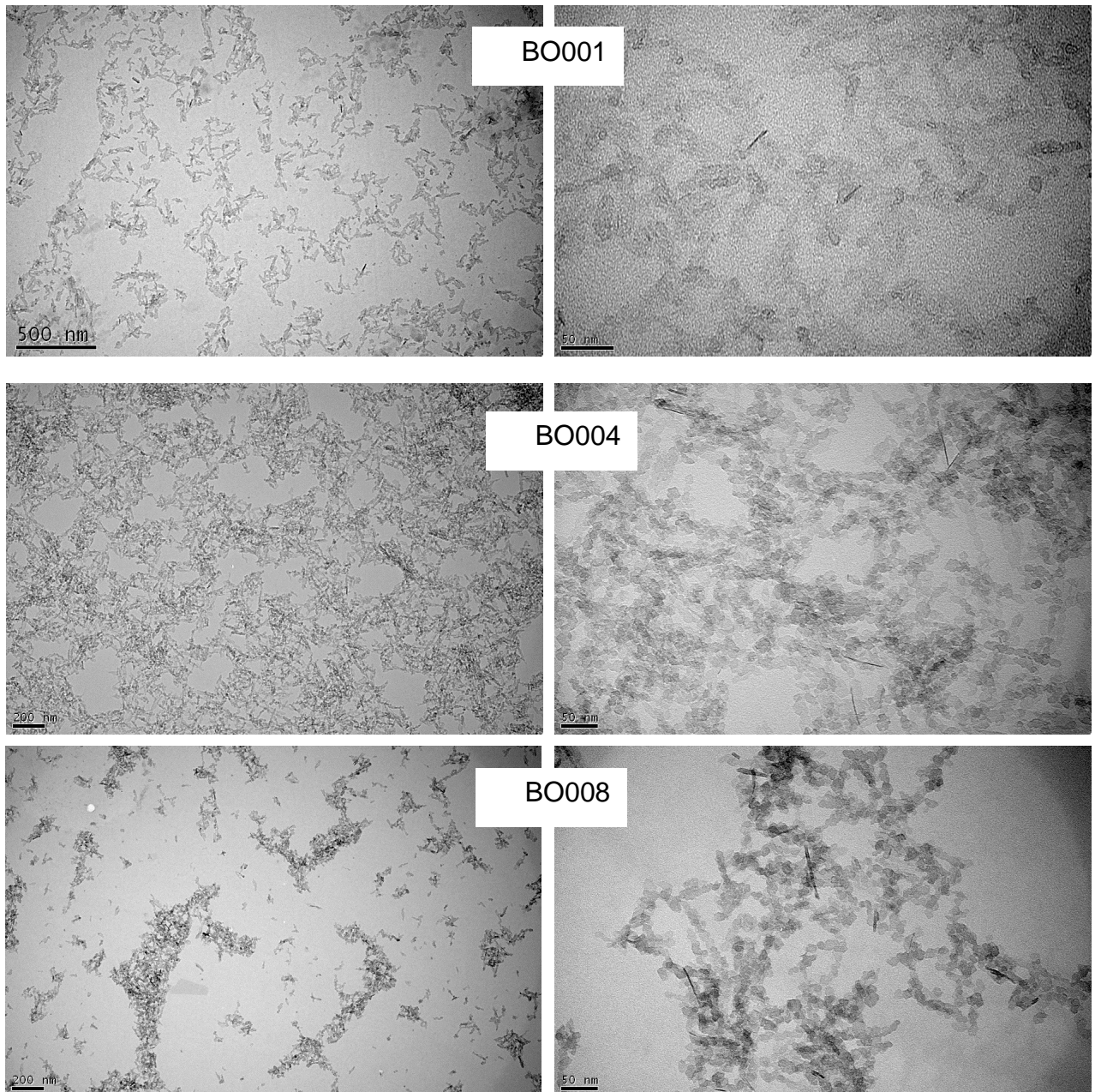
L'échelle représente 100µm pour les clichés de gauche et 10µm pour les clichés de droite.

Les observations microscopiques ne permettent pas de distinguer les particules au niveau morphologique. En effet les différentes particules sont de manière globale, polydisperses et de même morphologie. Nous retrouvons des particules grossières de formes aléatoires de 10 à 200µm avec la présence de plus petites particules fixées à la surface des agrégats de 1 à 5µm.

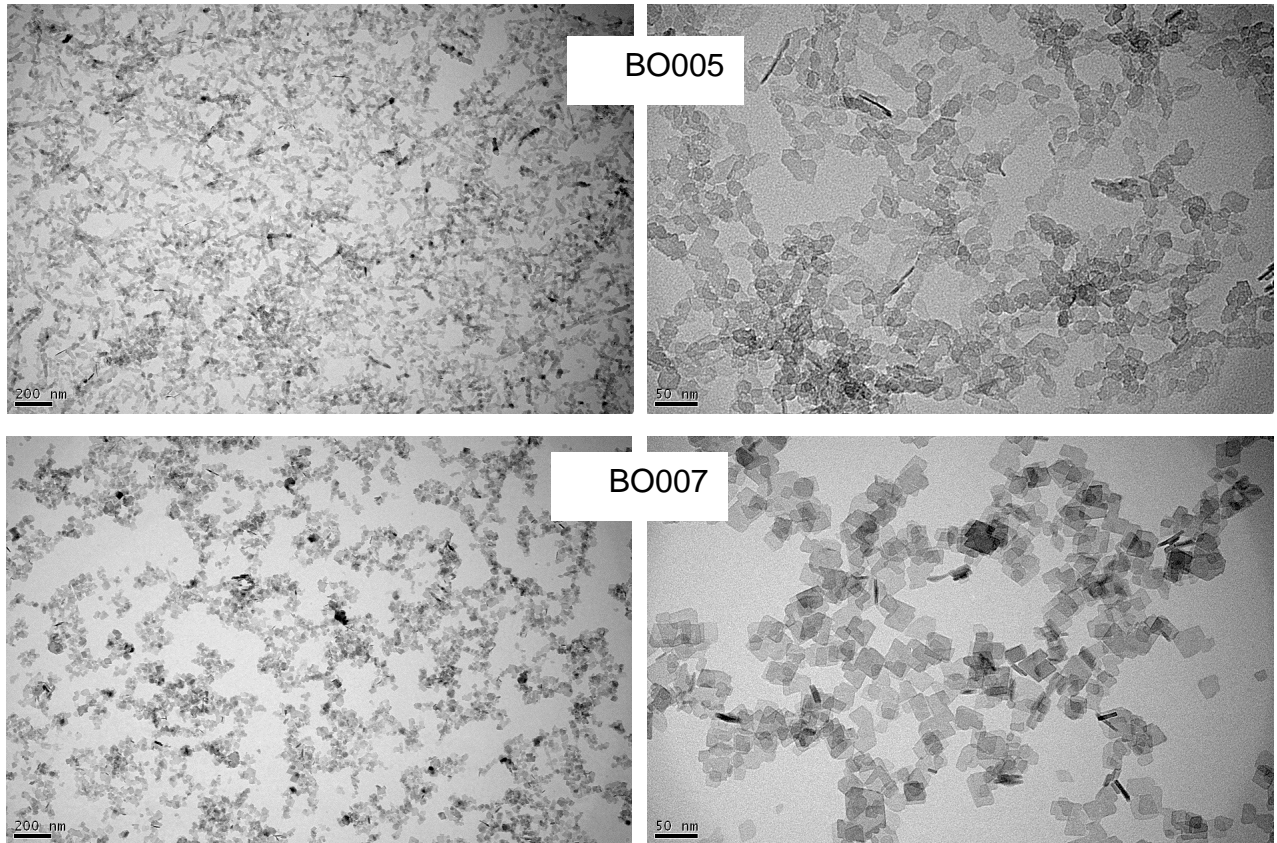




*Figure 93: Images MET des échantillons de faible cristallinité (Ecole des Mines de Paris)*



*Figure 94: Images MET des échantillons de cristallinité moyenne (Ecole des Mines de Paris)*



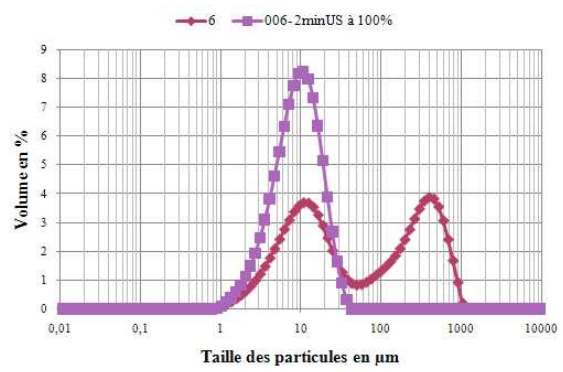
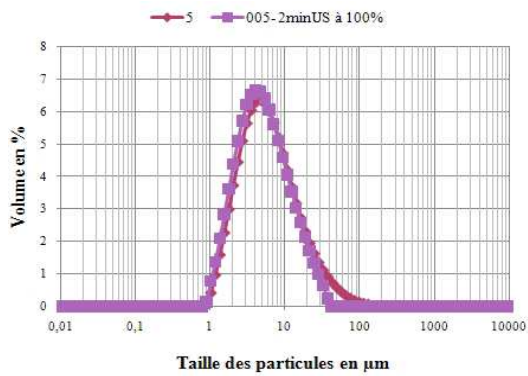
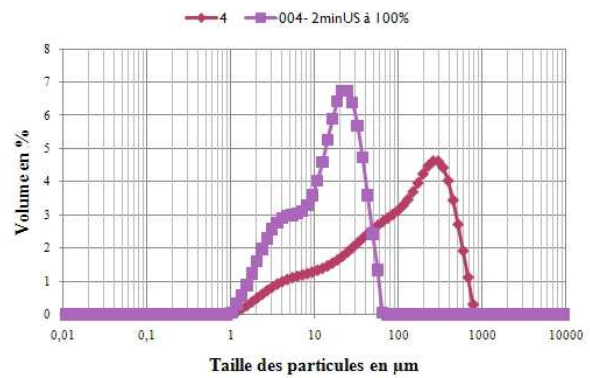
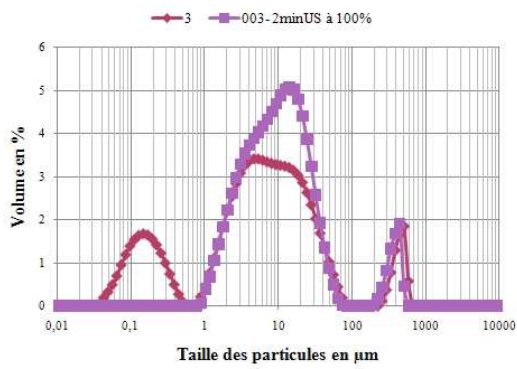
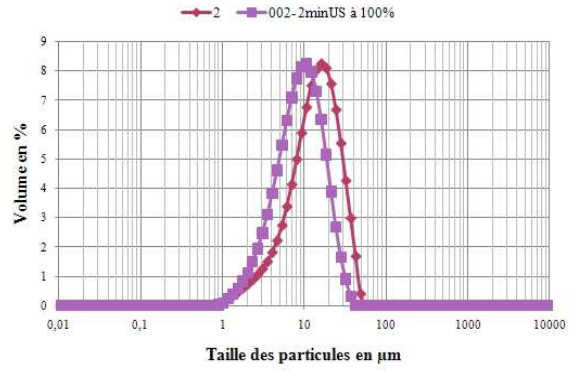
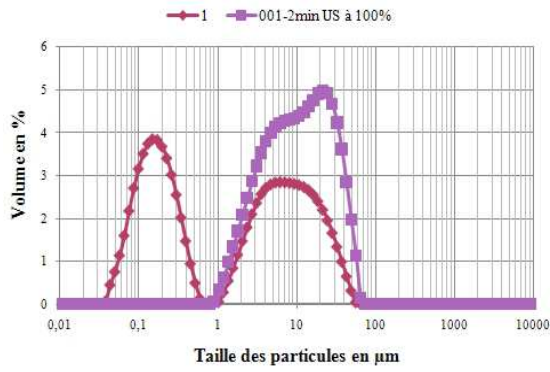
**Figure 95 : Images MET des échantillons de cristallinité forte (Ecole des Mines de Paris)**

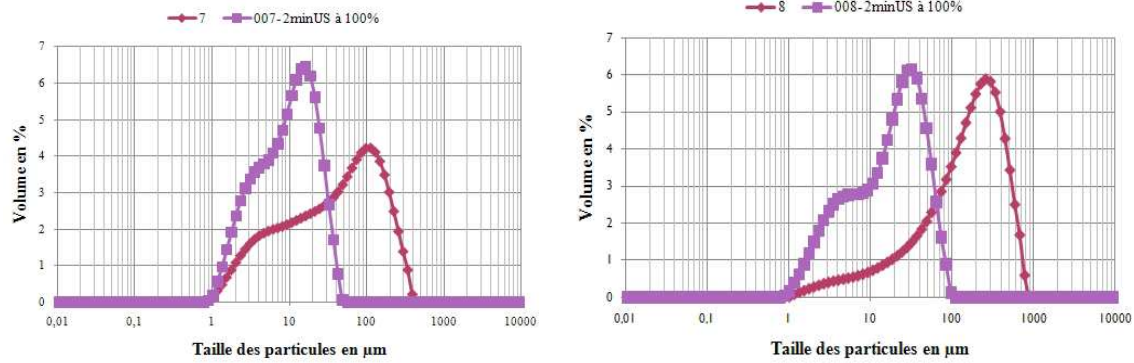
Les poudres 2, 3, 6 présentent un aspect de feuillets de 5 à 10nm. Pour les poudres 1, 4 et 8 nous distinguons des particules comprises entre 5 et 10nm et enfin pour les particules 5 et 7 nous observons des particules bien facettées de taille plus importante (20 à 50nm). Nous constatons donc bien une amélioration de la cristallisation au vu des images MET obtenues.

### III.3.1.2. Analyse granulométrique des poudres

#### III.3.1.2.1. *Granulométrie laser*

La distribution granulométrique des différentes poudres a été déterminée par granulométrie laser en voie liquide (solvant : eau).





**Figure 96 : Distribution en taille par granulométrie laser des différentes particules de boehmite synthétisées brute et après 2 min d'ultrasons**

De la même façon que pour les poudres industrielles, les mesures ont été réalisées sur les poudres brutes mais aussi après 2 min d'ultrasons à 26W. Nous observons pour les poudres 2, 4, 5, 6, 7 et 8 une désagglomération après 2 min d'ultrasons.

En ce qui concerne les poudres 1 et 3, une population nanométrique apparaît avant utilisation des ultrasons, et n'est pas retrouvée après ultrasons. Il est possible que ces particules s'agglomèrent après ultrasons où au contraire se désagglomèrent et ne sont plus à ce moment dans la gamme de mesure du granulomètre par diffraction laser. Nous approfondirons nos résultats par des mesures par spectroscopie de corrélation de photons, cette technique étant plus adaptée pour les nanoparticules.

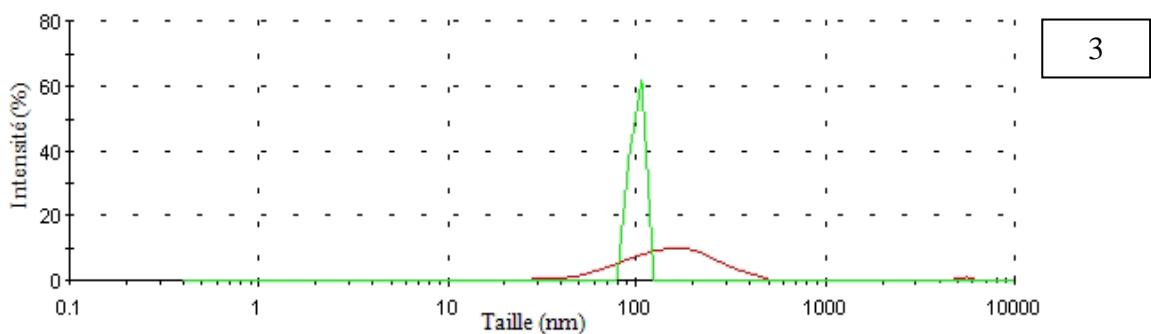
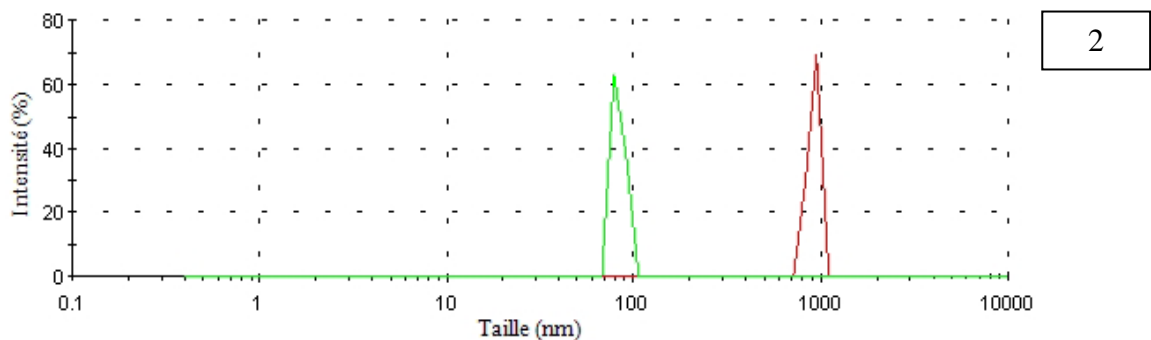
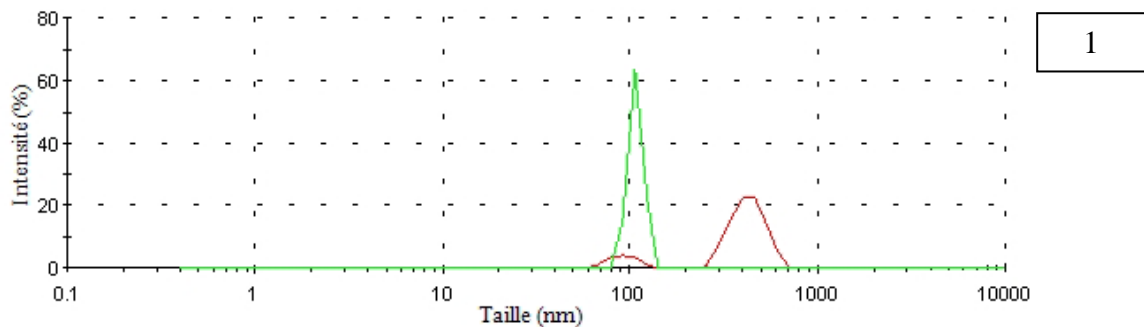
Echantillons	Granulométrie Diamètre médian D <sub>50</sub> (µm)	Granulométrie Diamètre médian D <sub>50</sub> (µm) après 2min d'ultrasons (26W)	Monodisperse ou polydisperse	Présence d'une population nanométrique
<b>1</b>	2,34	10,55	Polydisperse	Oui
<b>2</b>	14,01	9,11	Monodisperse	Non
<b>3</b>	6,05	10,13	Polydisperse	Oui
<b>4</b>	105,94	15,13	Polydisperse	Non
<b>5</b>	5,48	4,80	Monodisperse	Non
<b>6</b>	34,94	9,20	Polydisperse	Non
<b>7</b>	42,46	10,02	Polydisperse	Non
<b>8</b>	162,95	18,88	Polydisperse	Non

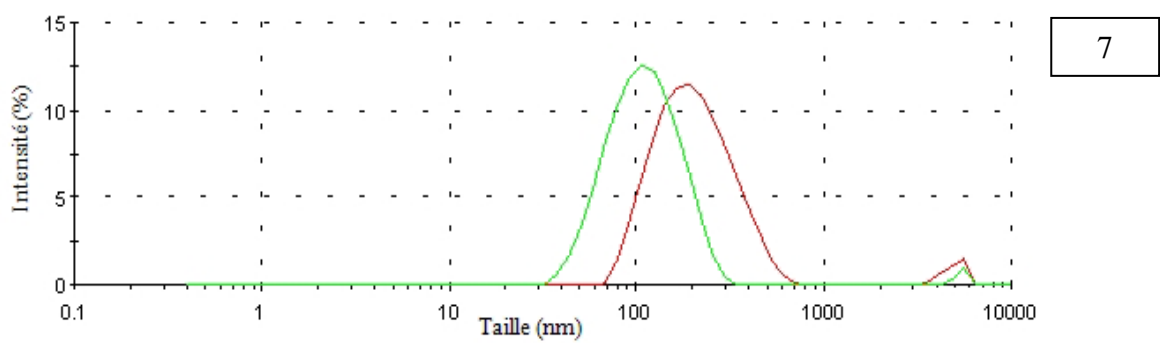
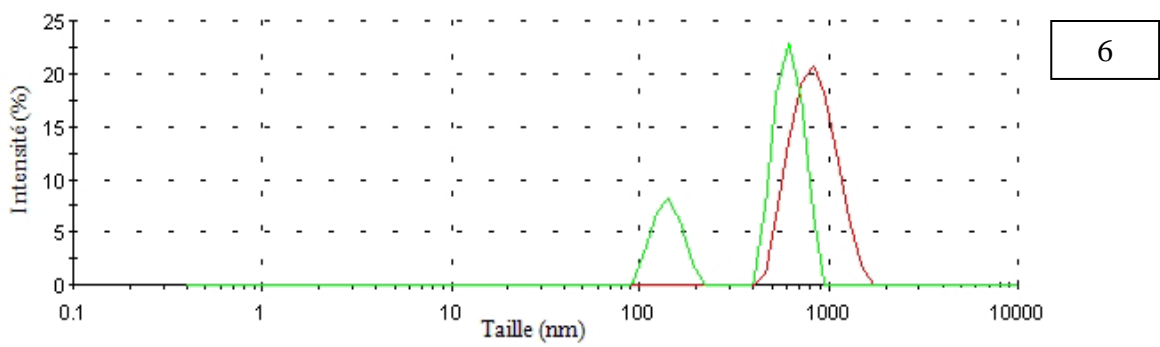
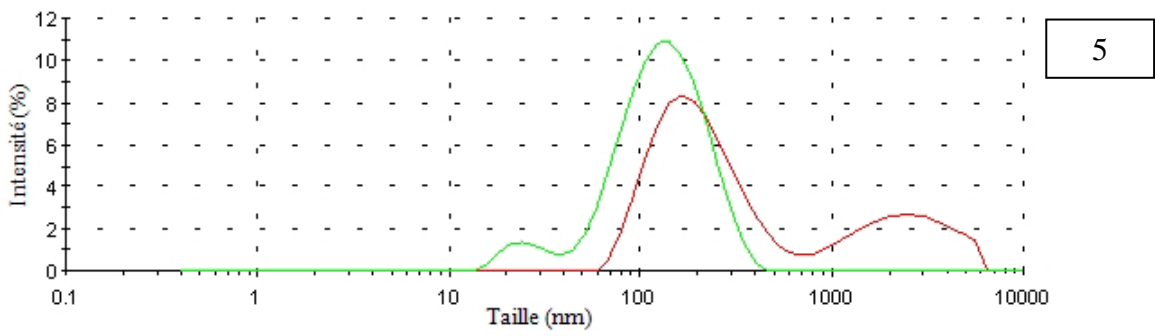
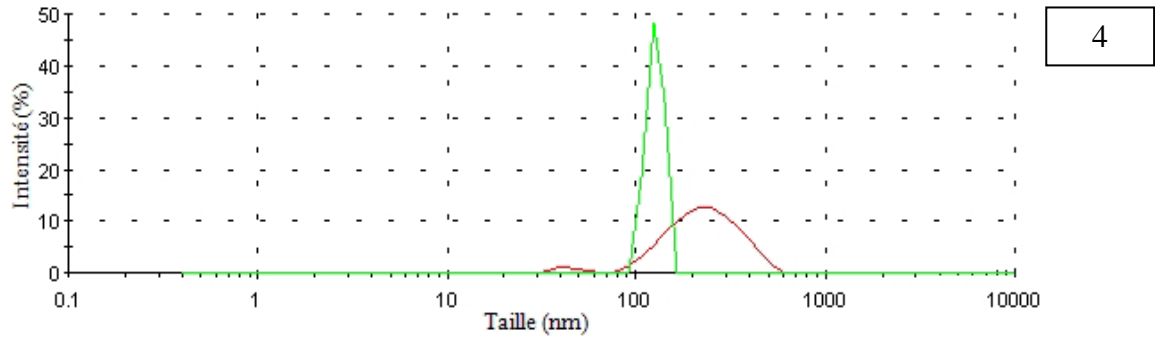
**Tableau 15 : Granulométries des différentes particules de boehmite avant et après ultrasons**

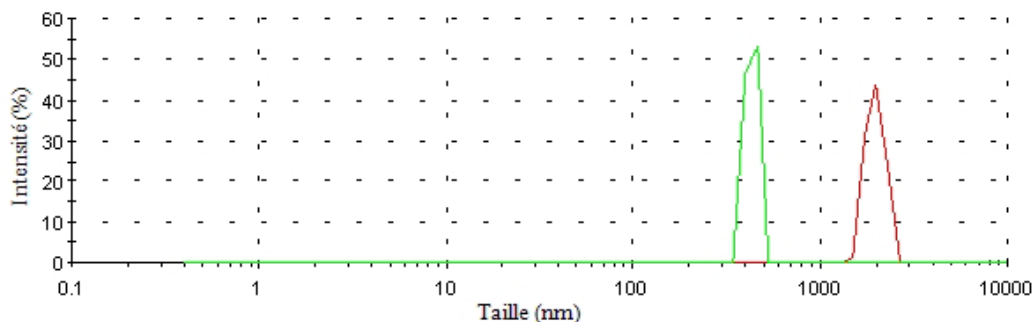
Les résultats obtenus montrent avant ultrasons des résultats complètement différents avec des diamètres médians variables, alors qu'après 2 min d'ultrasons nous constatons que les diamètres sont du même ordre de grandeur pour les différentes poudres (environ 10 $\mu$ m) avec cependant des différences importantes pour les poudres 5 et 8. Nous avons alors trois groupes : la poudre 5 dont le diamètre médian est inférieur à 5 $\mu$ m, les poudres dont le diamètre médian est compris entre 5 et 15 $\mu$ m (1, 2, 3, 4, 6 et 7) et enfin la poudre ayant un diamètre médian supérieur à 15 $\mu$ m, la poudre 8.

### III.3.1.2.2. Spectroscopie de corrélations de photons

Les mesures de spectroscopie de corrélations de photons ont été réalisées dans l'eau ultra pure mQ à pH 6,8 sur l'ensemble des particules.







**Figure 97 : Distribution de taille en intensité par spectroscopie de corrélation de photons des différentes particules de boehmite dans l'eau (rouge) et après 1min d'ultrasons à 300W (vert)**

Echantillons	Granulométrie (nm)	Monodisperse ou polydisperse	Granulométrie (nm) après 1 min d'ultrasons (300W)	Monodisperse ou polydisperse
<b>1</b>	428,6 et 92,63	Polydisperse	107,2	Monodisperse
<b>2</b>	915,3	Monodisperse	83,4	Monodisperse
<b>3</b>	193,2	Monodisperse	100,2	Monodisperse
<b>4</b>	242,2 et 42,90	Polydisperse	125,8	Monodisperse
<b>5</b>	215,4 et 2562	Polydisperse	25,83 et 145,4	Polydisperse
<b>6</b>	847,7	Monodisperse	140,2 et 618,6	Polydisperse
<b>7</b>	218 et 4913	Polydisperse	210	Monodisperse
<b>8</b>	1970	Monodisperse	429,3	Monodisperse

**Tableau 16 : Granulométries des différentes particules de boehmite dans l'eau par spectroscopie de corrélation de photons**

Après 1 min d'ultrasons à 300W nous constatons une importante désagglomération sur l'ensemble des particules. Hormis les particules 6 et 8, les autres particules ont une distribution de taille centrée sur 100 nm. Les particules 8 ont des agrégats plus gros, de l'ordre de 400 nm. Les particules 6 semblent plus difficiles à disperser, nous observons deux populations, une centrée sur 150 nm et l'autre sur 600 nm.



Après dispersion par ultrason, les résultats peuvent être divisés en trois catégories : les nanoparticules centrées sur 100nm (1, 2, 3, 4), les nanoparticules centrées sur 100nm et ayant aussi des agglomérats submicronique (5 et 6) et les agglomérats submicroniques (7 et 8).

En conclusion, les différentes techniques de granulométries permettent d'obtenir des informations complémentaires. La granulométrie laser permet de mesurer les agglomérats et conduit alors à trois groupes : la poudre 5 dont le diamètre médian est inférieure à 5 $\mu$ m, les poudres dont le diamètre médian est compris entre 5 et 15 $\mu$ m (1, 2, 3, 4, 6 et 7) et enfin la poudre ayant un diamètre médian supérieur à 15 $\mu$ m, la poudre 8. La spectroscopie de corrélation de photons a permis de mesurer la taille des nanoparticules après désagglomération aux ultrasons à 300W pendant 1min. Après cette désagglomération les nanoparticules sont centrées sur 100nm (1, 2, 3, 4, 5, 6), certaines d'entre elles montrent des agglomérats submicroniques (5 et 6) et enfin les particules 7 et 8 qui possèdent seulement des agglomérats submicroniques.

### III.3.2. Potentiel zêta et point isoélectrique

Pour l'ensemble des particules nous avons déterminé le potentiel zêta à pH 7 ainsi que le point isoélectrique.

Echantillons	pI	$\xi_{\text{eau}}$ en mV
<b>1</b>	9,51	41
<b>2</b>	10,40	36
<b>3</b>	9,91	30
<b>4</b>	9,80	33
<b>5</b>	9,06	27
<b>6</b>	7,42	12
<b>7</b>	8,41	28
<b>8</b>	9,45	32

*Tableau 17: Point isoélectrique des particules et potentiel zêta dans l'eau à pH 7*

A pH 7 les différentes particules sont chargées positivement dans l'eau, elles sont aussi assez stables à ce pH puisque la plupart des potentiels zêtas sont supérieur à 30mV. Ceci a un grand intérêt lors de nos tests biologiques qui se déroulent à ce même pH.

En ce qui concerne les points isoélectriques nous remarquons qu'excepté pour les particules 6 et dans une moindre mesure pour les particules 2, les résultats sont homogènes avec des points isoélectriques situés autour du pH 9.

### III.3.3. Surface spécifique

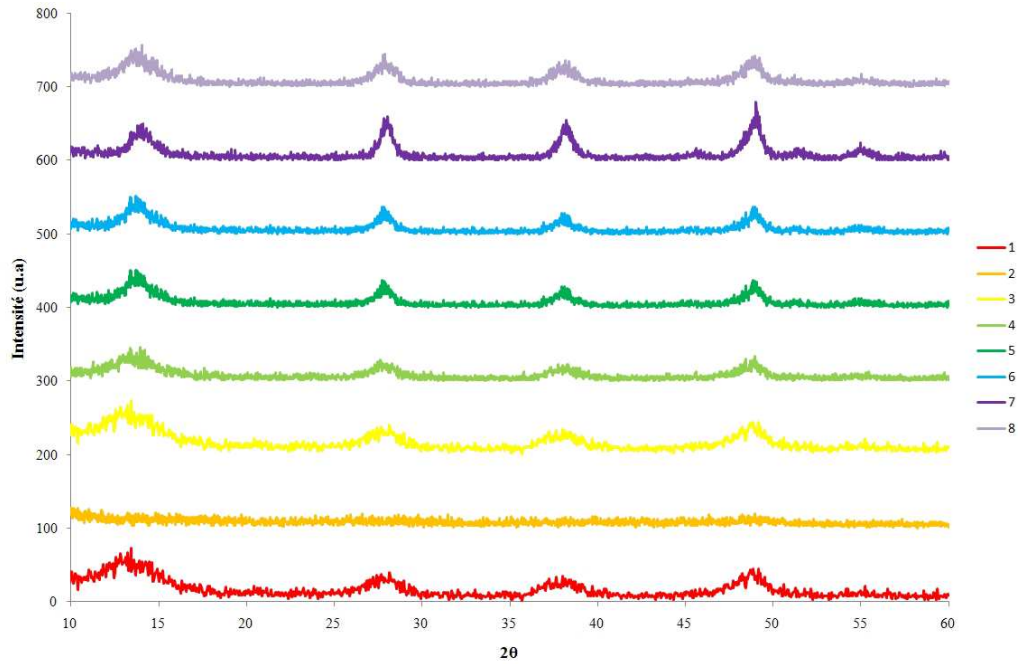
Les résultats de surface spécifique sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 18) :

Echantillons	Surface spécifique ( $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ )	Diamètre des particules primaires en nm
<b>1</b>	281,26±1,21	7,1
<b>2</b>	-	-
<b>3</b>	268,88±0,30	7,4
<b>4</b>	231,50±0,89	8,6
<b>5</b>	185,63±1,93	10,7
<b>6</b>	263,15±0,77	7,6
<b>7</b>	132,10±0,54	15,0
<b>8</b>	215,31±0,79	9,3

*Tableau 18 : Surface spécifique des particules de boehmite synthétisées*

Les différentes particules présentent des surfaces spécifiques assez élevées (entre 130 et  $280\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux attendus à l'exception de la poudre « 2 », dont la surface spécifique n'a pas pu être mesurée. En ce qui concerne le diamètre des particules primaires nous observons deux groupes. Un groupe dont les diamètres sont inférieurs à 10nm (1, 3, 4, 6 et 8) et une autre groupe qui correspond aux particules ayant des diamètres de particules primaires supérieurs à 10nm (5 et 7), comme nous l'avons vu lors des observations en microscopie électronique à transmission (Figure 93, Figure 94, Figure 95).

### III.3.4. Structure cristalline



*Figure 98 : Diffractogramme de rayons X des particules de boehmite*

Les diffractogrammes obtenus (Figure 98) nous permettent de confirmer que les particules étudiées sont de la boehmite. Dans un second temps nous retrouvons bien les différents niveaux de cristallisation attendus. Les particules 7 étant les mieux cristallisées alors qu'au contraire les particules 2 sont amorphes en diffractométrie des rayons X.

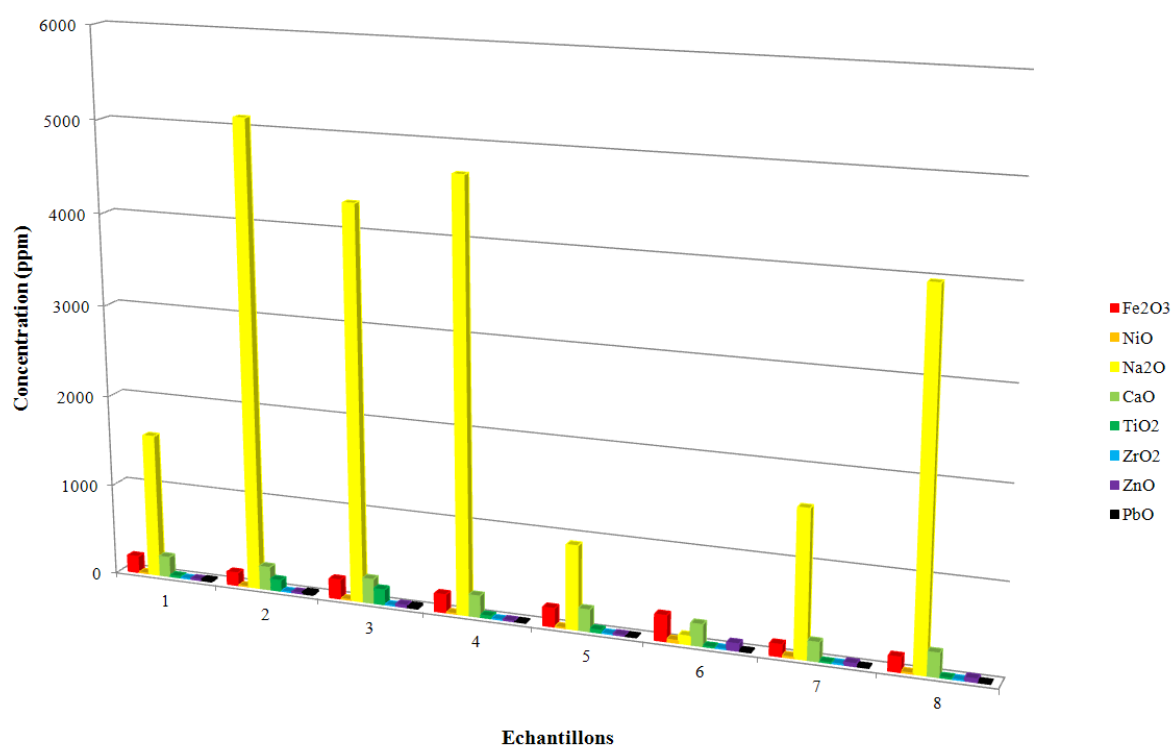
Echantillons	Taille des cristallites (nm)	Diamètre des particules primaires en nm Méthode (BET)
<b>1</b>	4,4	7,1
<b>2</b>	-	-
<b>3</b>	4,9	7,4
<b>4</b>	6,1	8,6
<b>5</b>	9,7	10,7
<b>6</b>	5,1	7,6
<b>7</b>	13,5	15,0
<b>8</b>	7,7	9,3

*Tableau 19: Tailles de cristallites déterminées par la méthode de Debye Scherrer*

Les différentes particules ont des tailles de cristallites relativement proches, en dessous de 10nm excepté pour les particules 7. Seule la taille des cristallites de la poudre 2 n'a pas pu être déterminée du à l'absence de pic de diffraction.

Les résultats obtenus par le biais de cette méthode sont en accord avec ceux obtenus par le calcul du diamètre de particules primaires avec la surface spécifique et la masse volumique. Les différentes particules ont des tailles de cristallites du même de grandeur (dizaine de nm) cependant deux groupes se distinguent. Un groupe dont la taille des cristallites est inférieur à 10nm (1, 3, 4, 6 et 8) et un autre groupe qui correspond aux particules ayant des tailles de cristallites supérieures à 10nm (5 et 7). Les particules 5 et 7 se différencient également par leur synthèse. En effet elles ont été chauffées à haute température pendant une durée plus importante que les autres. Elles sont ainsi mieux facettées et mieux cristallisées.

### III.3.5. Analyse chimique des poudres de boehmite



**Figure 99 : Concentration des impuretés des particules de boehmite synthétisées**

Nous constatons la présence de fer, de calcium, de titane, le zirconium, de nickel, de zinc ainsi que de plomb dans chacun des échantillons mais en quantité très faible. Le sodium est quant à lui retrouvé en plus grande quantité dans chacune des poudres étudiées ceci est dû à l'utilisation de la soude pour synthétiser ces particules. Il n'y a toutefois pas réellement de corrélation entre le niveau d'impuretés et les différentes synthèses.

### III.3.6. Conclusion intermédiaire

En résumé, les particules de boehmite élaborées par synthèse hydrothermale à l'échelle du laboratoire sont polydisperses avec des diamètres médians différents. Elles se présentent sous forme d'agglomérats, et sont facilement désagglomérables hormis les particules 6 après 1 min d'ultrasons à 300W.

Elles peuvent être divisés en trois catégories en terme de tailles : les nanoparticules centrées sur 100nm (1, 2, 3, 4), les nanoparticules centrées sur 100nm et ayant aussi des agglomérats submicronique (5 et 6) et les agglomérats submicroniques (7 et 8).

Elles possèdent des impuretés de l'ordre du ppm et notamment du sodium dû à l'utilisation de la soude dans le procédé de synthèse.

Les échantillons sont regroupés en 3 familles de cristallinité/taille croissante.

- Les échantillons 2, 3, 6 de faible cristallisation: mûrissement hydrothermal à 150°C, présentant un aspect de feuillets et développant des surfaces spécifiques de l'ordre de 250-300 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>.

- Les échantillons 1, 4, 8 de cristallisation "moyenne", obtenus à 180°C pendant des temps de cristallisation courts. La surface spécifique est encore assez élevée 200-250 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> mais significativement plus faible que celle des feuillets.

- Les échantillons 5 et 7 de forte cristallisation, obtenus à 180°C pendant des temps de cristallisation relativement longs. Nous observons des particules bien facettées. Les surfaces spécifiques sont sensiblement inférieures à 200 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, elles possèdent les tailles de particules primaires les plus grandes supérieures à 10nm.

		Echantillons							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Caractérisations physicochimiques	D <sub>50</sub> en µm (Granulométrie laser)	2,34	14,01	6,05	105,94	5,48	34,94	42,46	162,95
	Diamètre des populations en nm Eau (PCS)	92,6 428,6	915,3	193,2	42,90 242,2	215,4 2562	847,7	218 4913	1970
	Diamètre des populations en nm Eau (PCS) 1 min US (300W)	107,2	83,4	100,2	125,8	25,83 145,4	140,2 618,6	210	429,3
	Surface spécifique en m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	281,26	1,44	268,88	231,50	185,63	263,15	132,10	215,31
	D <sub>pp</sub> en nm	7,1	-	7,4	8,6	10,7	7,6	15,0	9,3
	Taille des cristallites en nm	4,4	-	4,9	6,1	9,7	5,1	13,5	7,7
	Point isoélectrique	9,51	10,40	9,91	9,80	9,06	7,42	8,41	9,45
	ξ <sub>eau</sub> en mV	41	36	30	33	27	12	28	32
	Impuretés ICP en ppm	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :181 Na <sub>2</sub> O:1577 CaO:217, Traces deTiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , PbO, ZnO,NiO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :140 Na <sub>2</sub> O:5111 CaO:250, Traces deTiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , PbO, ZnO,NiO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :212 Na <sub>2</sub> O:4300 CaO:264, Traces deTiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , PbO, ZnO,NiO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :198 Na <sub>2</sub> O:4682 CaO:230, Traces deTiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , PbO, ZnO,NiO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :201 Na <sub>2</sub> O:913 CaO:235, Traces deTiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , PbO, ZnO,NiO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :281 Na <sub>2</sub> O:90 CaO:233, Traces deTiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , PbO, ZnO,NiO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :128 Na <sub>2</sub> O:1590 CaO:232, Traces deTiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , PbO, ZnO,NiO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :159 Na <sub>2</sub> O:3927 CaO:252, Traces deTiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , PbO, ZnO,NiO

Tableau 20: Récapitulatif des données physico chimiques des différentes particules de boehmite synthétisées

### III.4. Conclusion

Les différents types de particules montrent des paramètres différents notamment en ce qui concerne la taille, la morphologie, les impuretés sur lesquels il sera important de revenir lors de l'évaluation biologique des particules.

En effet nous constatons des différences aux niveaux des surfaces spécifiques et donc de la taille des particules primaires avec des tailles légèrement inférieures pour les particules élaborées par synthèse hydrothermale. Les différents procédés de synthèse entraînent aussi des différences au niveau des impuretés. Nous retrouvons dans les particules industrielles du silicium et du phosphate absent des particules obtenues par synthèse hydrothermale. Quant à elles, elles possèdent du sodium en plus grande quantité ainsi que du plomb. En ce qui concerne la morphologie, les différentes particules sont sous formes agglomérées, sous formes de plaquettes pour les différentes particules obtenues par synthèse hydrothermale et les particules CAM, en effet seules les particules dispersal et V250 sont sous forme sphérique et la bulky sous forme de feuillets.

L'étude de la solubilité de la boehmite dans nos travaux à montrer qu'au pH étudié (pH 7) seulement 1ppm d'aluminium était dissous. Cette concentration est largement en dessous de la concentration d'aluminium dans l'eau de consommation ( $200\mu\text{g.L}^{-1}$ , IPCS 1997). Cette étude permet de conforter le fait que lors des tests biologiques nous mesurons bien l'effet de la boehmite sur les cellules et non l'effet des ions aluminium.

Les particules étudiées sont susceptibles de pénétrer et de se déposer dans les alvéoles pulmonaires. Ces particules peuvent potentiellement réagir avec des protéines, des enzymes ou encore des biomolécules et donc entrainer la formation de radicaux libres mais au vu des résultats de RPE les particules de boehmite étudiées n'ont pas la capacité de former des radicaux libres. Les résultats sont au niveau du bruit de fond.

Compte tenu de leur grande surface spécifique il est connu que les nanoparticules peuvent entraîner des phénomènes d'adsorption de biomolécules qui peuvent être plus ou moins importants. Ce phénomène sera détaillé dans la partie interactions nanoparticules – protéines (Chapitre V).

Dans la prochaine partie nous traiterons les résultats d'activité biologique que nous mettrons en corrélation avec les données de physicochimie des différents types de particules.





# Chapitre IV. EVALUATION DE LA TOXICITÉ BIOLOGIQUE DES POUDRES DE BOEHMITE



# SOMMAIRE

Chapitre IV. Evaluation de la toxicité biologique des poudres de boehmite _____	199
<b>IV.1. Poudres industrielles _____</b>	<b>203</b>
IV.1.1. Poudres industrielles brutes et traitées _____	203
IV.1.2. Evolution globale de l'activité biologique _____	218
IV.1.3. Génotoxicité _____	223
IV.1.4. Conclusion intermédiaire _____	225
<b>IV.2. Activité biologique des particules élaborées par synthèse hydrothermale _____</b>	<b>227</b>
IV.2.1. Activité biologique des particules avant dispersion _____	227
IV.2.2. Activité biologique des particules après dispersion _____	231
IV.2.3. Evolution globale de l'activité biologique _____	235
IV.2.4. Conclusion _____	239
<b>IV.3. Conclusion générale _____</b>	<b>241</b>



Dans ce chapitre sera présenté l'ensemble des données obtenues portant sur l'évaluation de l'activité biologique des différentes particules de boehmite, industrielles ou élaborées par synthèse hydrothermale, et ce après contacts *in vitro* avec des cellules de macrophages. Différents paramètres cellulaires et moléculaires ont été analysés : l'état d'inflammation, l'endommagement et la mort cellulaire, le stress oxydant. Une partie sera consacrée à des essais préliminaires sur la génotoxicité avec le test des comètes.

Nous avons étudié l'ensemble des particules industrielles, des particules traitées (par broyage ou élutriation) et des particules élaborées par synthèse hydrothermale. En ce qui concerne les particules dites traitées, ne seront exposés dans le détail que les résultats obtenus avec les particules nanométriques qui ont entraîné le plus d'effets biologiques; la boehmite dispersal appelée dispersal « dustiness » et les particules de bulky broyée, les résultats concernant les autres types de particules seront placés en Annexe A et B.

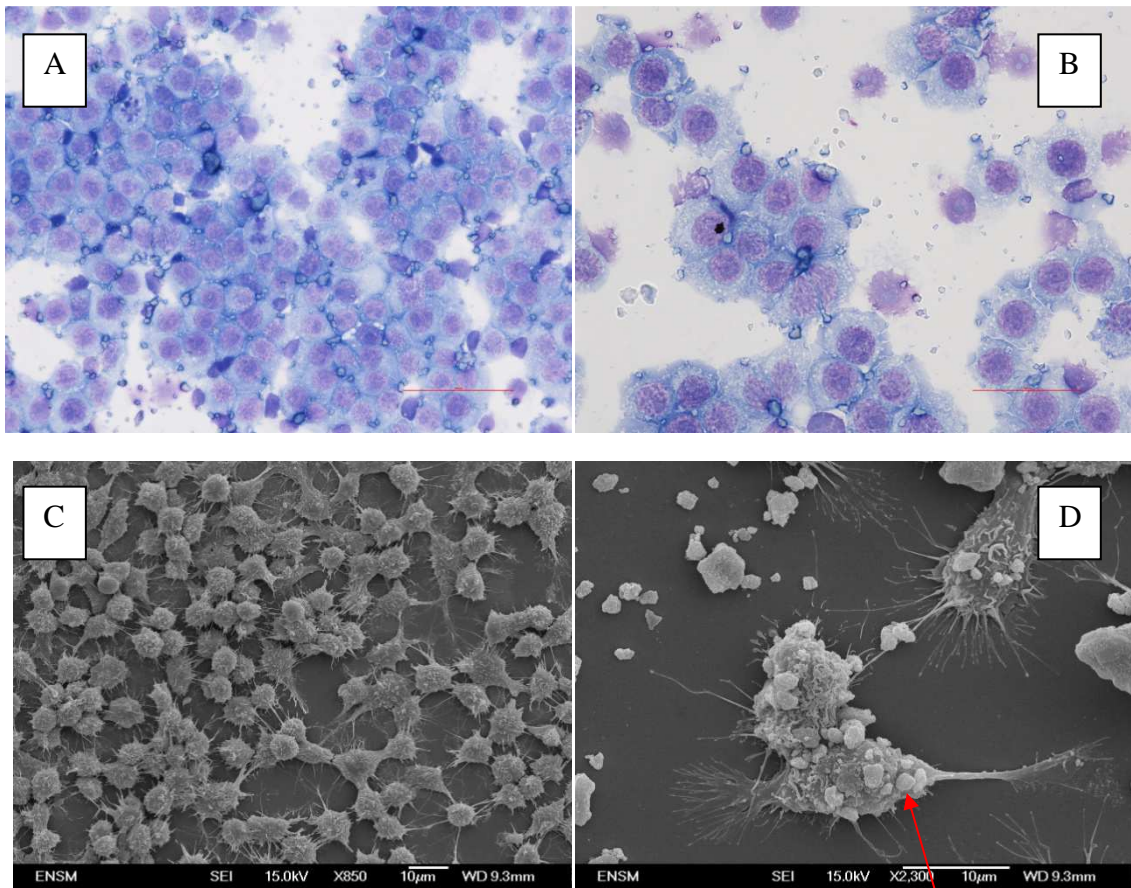
Les résultats seront présentés en fonction de la dose en masse qui nous paraît être la représentation la plus judicieuse dans notre étude. Les résultats ont été également représentés en fonction de la dose en surface et seront présentés dans le cas où ils apportent des informations complémentaires, dans le cas contraire ils seront placés en (Annexe C). En effet une étude d'Oberdorster a montré qu'il était utile de tracer les résultats en surface (I.1.3.1.4) et en masse pour avoir une meilleure interprétation des résultats.

## **IV.1. Poudres industrielles**

### **IV.1.1. Poudres industrielles brutes et traitées**

#### **IV.1.1.1. Morphologie cellulaire**

La morphologie des cellules a été observée en microscopie optique après coloration MGG ainsi qu'en microscopie électronique à balayage pour des cellules aux contacts de la boehmite (dispersal).



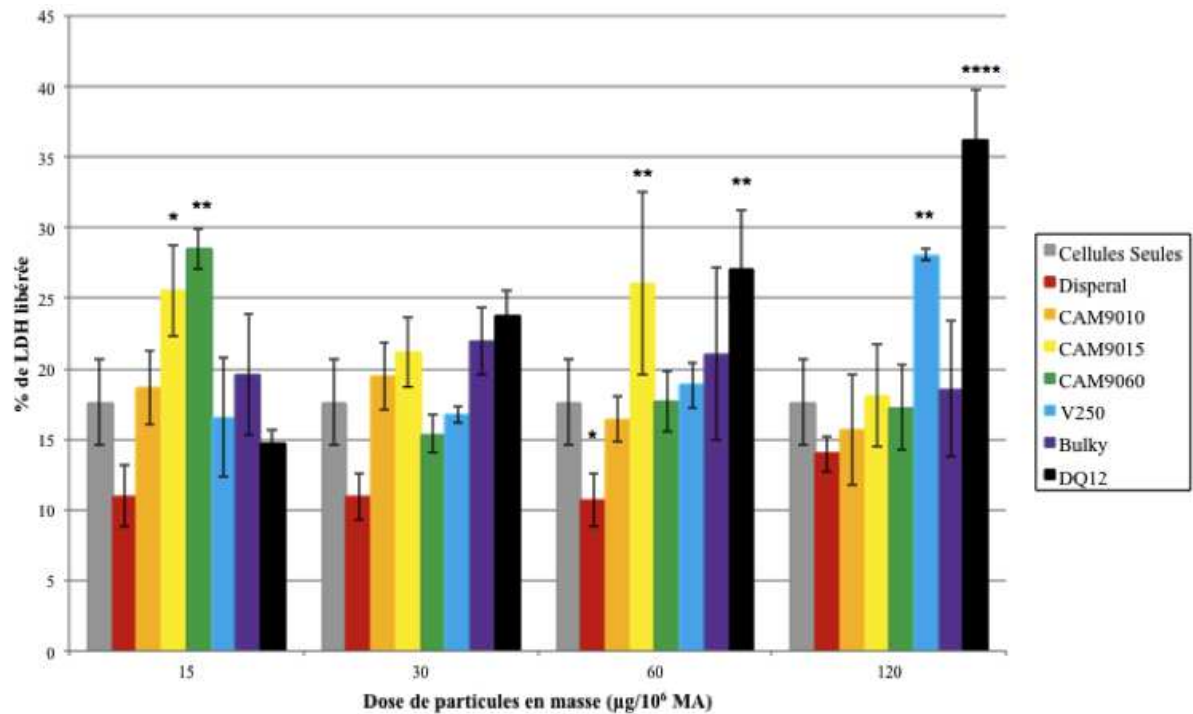
Adhésion

**Figure 100 : Contacts macrophages (RAW 264.7) et particules de boehmite (disperal) observés au microscope optique après coloration MGG (A, B) (respectivement x10, x60) et au microscope électronique à balayage (C, D) (respectivement x850, x2300)**

Ces images de microscopie optique en 2D montrent la présence de boehmite aux contacts des cellules (noyaux en violet et cytoplasme en bleu). Les clichés MEB viennent confirmer ces premières observations. Nous pouvons observer l'étape d'adhésion qui est le point de départ du processus de phagocytose.

#### IV.1.1.2. Perte d'intégrité membranaire: LDH

Les résultats montrent une cytotoxicité modérée avec des résultats très variables pour la plupart des particules de boehmite étudiées. Nous observons une relation de dose-dépendance pour les particules de DQ12 qui n'a pas été retrouvée pour les particules de boehmite.



**Figure 101: LDH libérée en pourcentage par rapport au témoin de cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

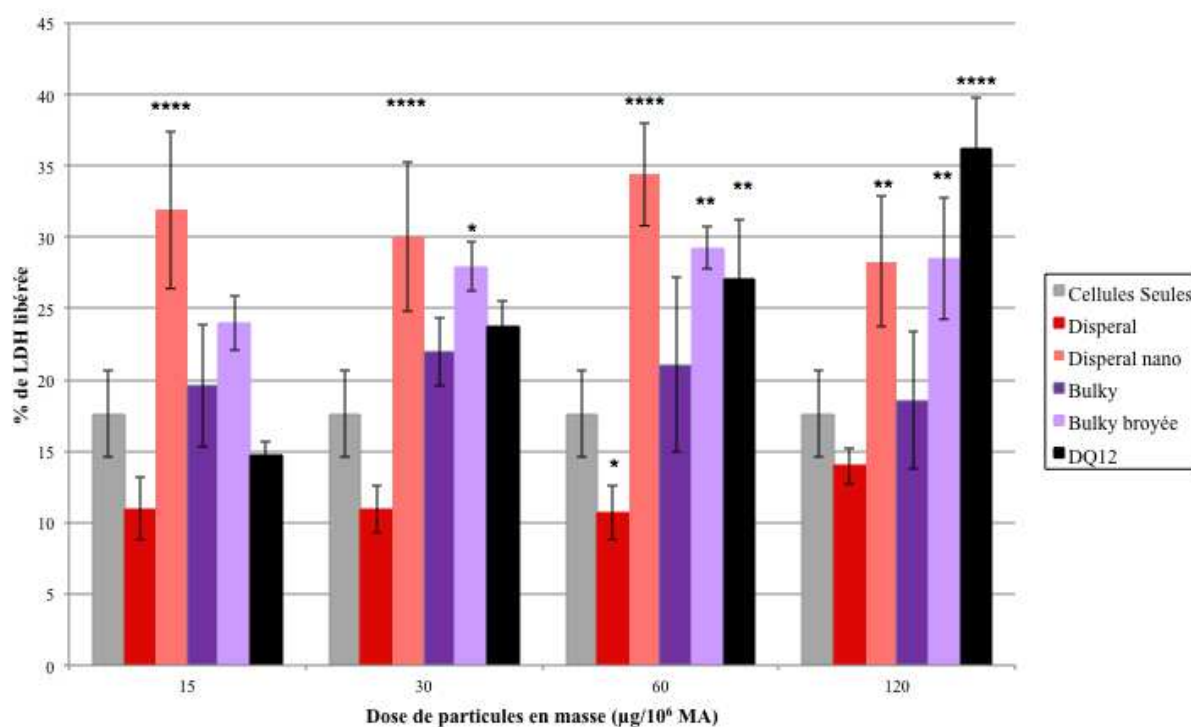
L'ensemble des particules ont conduit à un relargage modéré de LDH ( $11\% < \%LDH_{\text{relarguée}} \leq 25\%$ ) par rapport au témoin cellules seules ( $\%LDH_{\text{relarguée}} \approx 18\%$ ). Seules les particules de Disperal et de CAM9010 ont les résultats proches du témoin négatif de toxicité (cellules seules) (Figure 101, n=3 expériences indépendantes). Le quartz DQ12 ( $\%LDH_{\text{relarguée}} \approx 36\%$ ) montre avant tout une cytotoxicité importante par rapport au témoin négatif ainsi qu'une de relation dose-dépendance qui n'apparaît pas pour les particules de boehmite à l'exception de V250. Les particules de V250 sont les particules les moins agglomérées et possèdent la taille de cristallite la plus petite, 4nm.

En ce qui concerne les autres particules de boehmite nous constatons une dispersion importante autour d'une valeur moyenne faible ( $\%LDH_{\text{relarguée}} \approx 20\%$ ). Les résultats obtenus pour les particules de Disperal ( $\%LDH_{\text{relarguée}} \leq 15\%$ ), sont inférieurs au témoin négatif de toxicité ( $\%LDH_{\text{relarguée}} \approx 18\%$ ). Ces résultats sont paradoxaux et soulève le problème éventuel d'un phénomène d'adsorption de la LDH relarguée sur les particules entraînant des faux négatifs. Ce point sera plus spécifiquement abordé au chapitre suivant (Chapitre V).

Les résultats exprimés en fonction de la surface des particules ne soulignent pas l'implication de ce paramètre au niveau de la cytotoxicité (Annexe C, Figure 158).

Il existe deux manières de tracer les résultats en surface, soit en fonction de la taille des cristallites en utilisant la surface spécifique, soit en fonction de la taille des agglomérats. Dans notre cas nous avons converti les résultats en surface en fonction de la taille des agglomérats mais il n'existe pas une méthode plus juste l'une que l'autre.

Les résultats suivants représentent la perte d'intégrité membranaire lors du contact avec les particules traitées.



**Figure 102 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Les fractions fines entraînent un pourcentage de LDH libérée ( $23\% < \%LDH_{\text{Relarguée}} \leq 34\%$ ), plus important que pour les particules brutes ( $\%LDH_{\text{Relarguée}} \leq 20\%$ ), et proche du témoin positif de toxicité ( $\%LDH_{\text{Relarguée}} \approx 36\%$ , pour la dose de  $120\mu\text{g}$ ). Le pourcentage de LDH libérée est trois fois plus important pour les particules disperal « dustiness » que pour les particules disperal « brutes », et légèrement plus important pour les particules de bulky broyée par rapport aux particules de bulky « brutes ». Nous pouvons, pour les particules de disperal « dustiness », conclure à un effet taille. En effet lorsque la taille des agglomérats de disperal est diminuée, la cytotoxicité se montre plus importante. En ce qui concerne les particules de bulky broyée nous constatons le même phénomène. Les impuretés présentes dans les particules de bulky et de bulky broyée n'étant pas modifiées, le paramètre physico-chimique

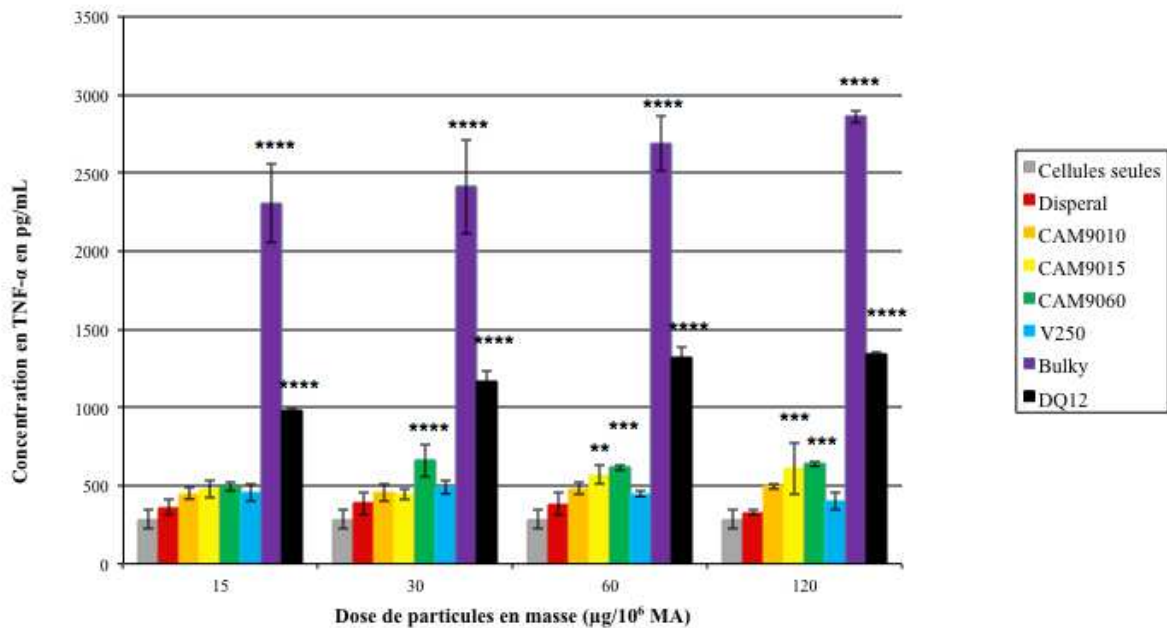


pouvant expliquer cette augmentation de la cytotoxicité est la taille des agglomérats qui a fortement diminuée. En effet la taille des agglomérats était de 2,2 $\mu$ m pour les particules de bulky, et après broyage les agglomérats étaient compris entre 100nm et 2 $\mu$ m. Il peut cependant avoir également un effet de la présence de surfaces activées à l'issue du broyage (surfaces riches en défauts et très réactives au moins d'un point de vue chimique).

Si nous comparons l'activité biologique des particules de disperal et de disperal « dustiness », pour une même surface, par exemple 1cm<sup>2</sup>, nous retrouvons le même effet avec un pourcentage en LDH libérée trois plus important pour les particules de disperal « dustiness ». Il n'y a donc pas d'artefacts dus à l'expression de la dose en masse ou en surface comme ce qu'avait montré Oberdorster. Il n'y a donc pas de problème méthodologique confirmant belle et bien un effet taille (Annexe C, Figure 160).

#### IV.1.1.3. Réaction inflammatoire

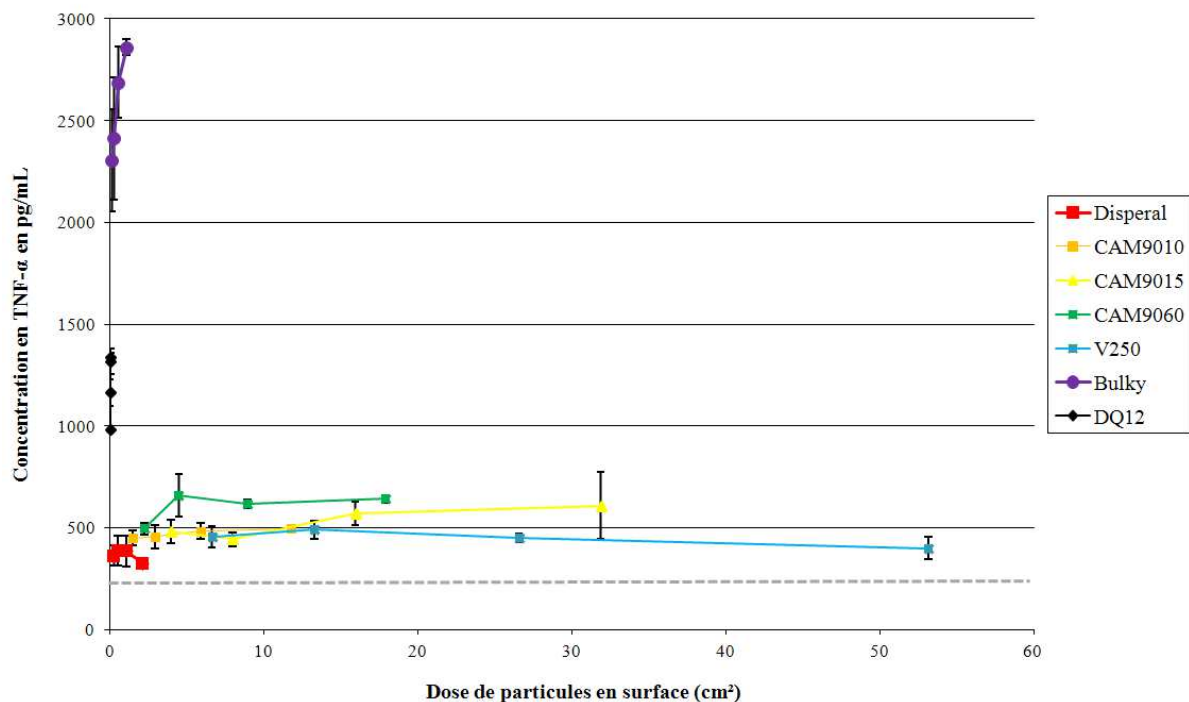
##### IV.1.1.3.1. *TNF- $\alpha$*



**Figure 103 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Ces résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes (Figure 103), avec des niveaux d'activité biologique proches pour les différentes particules (entre 400 et 600 pg.ml<sup>-1</sup>). Seules les particules de bulky montrent une production de TNF- $\alpha$  (entre 2300 et 2900 pg.ml<sup>-1</sup>) bien supérieure à celle du témoin positif de toxicité (entre 1000 et 1400 pg.ml<sup>-1</sup>) et en moyenne cinq fois plus élevée par rapport aux autres particules. De plus, nous observons une relation de dose-dépendance pour le quartz DQ 12, les particules de bulky et CAM. Les particules de V250 et disperal ne montrent pas de relation de dose dépendance. Si l'on compare les différentes particules entre elles nous constatons une différence significative entre les particules de disperal et de CAM9060 ( $P < 0,001$ ) pour les trois plus importantes doses.

La réponse inflammatoire importante que semble générer le contact cellulaire avec les particules de bulky pourrait s'expliquer par le fait qu'elle forme, à la différence des autres particules, des agglomérats micrométriques. De plus les particules de bulky possèdent des tailles de cristallites plus élevées proches de la centaine de nanomètre et des impuretés de plomb.



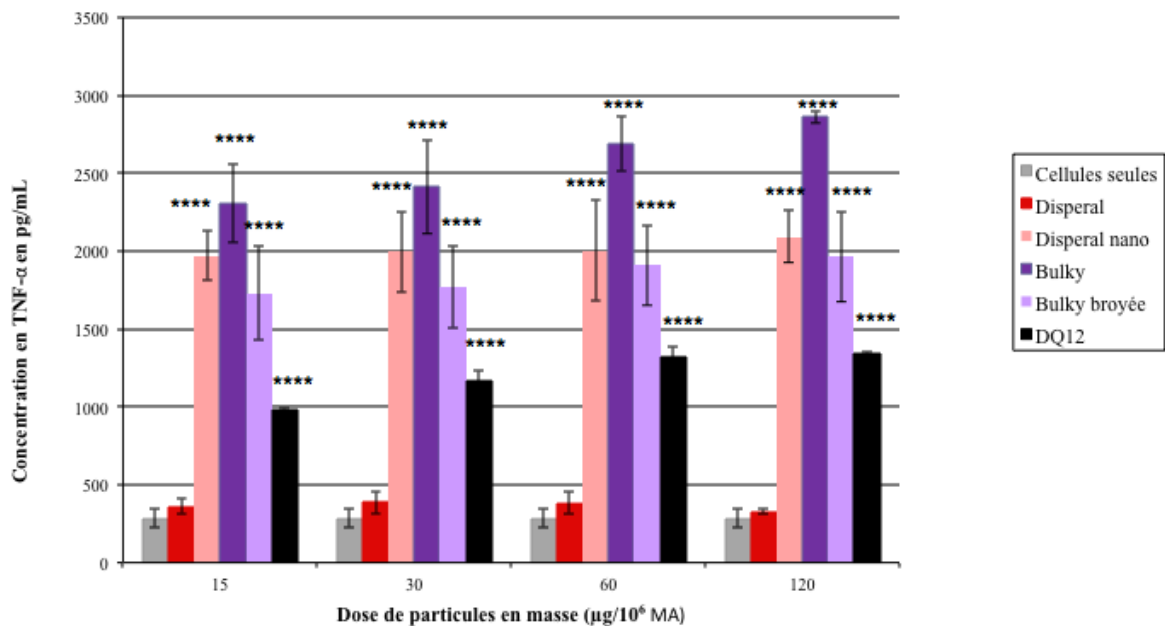
**Figure 104 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3)**

L'activité biologique pour une même surface d' 1 cm<sup>2</sup>, montre une concentration en TNF- $\alpha$  cinq fois plus importante pour les particules de bulky que pour les autres particules de boehmite. L'activité biologique des particules de bulky est donc nettement supérieure à celle

des autres particules. Il n'y a donc pas d'artefacts spécifiques dus à l'expression de la dose mais vraiment un effet de la taille des particules de bulky.

Pour ce paramètre du TNF- $\alpha$ , le point important mis en évidence par cette analyse est donc l'effet biologique important des particules de bulky qui possèdent une taille différente des autres.

Les résultats obtenus pour les particules de boehmite dites traitées sont représentés sur le graphique suivant :



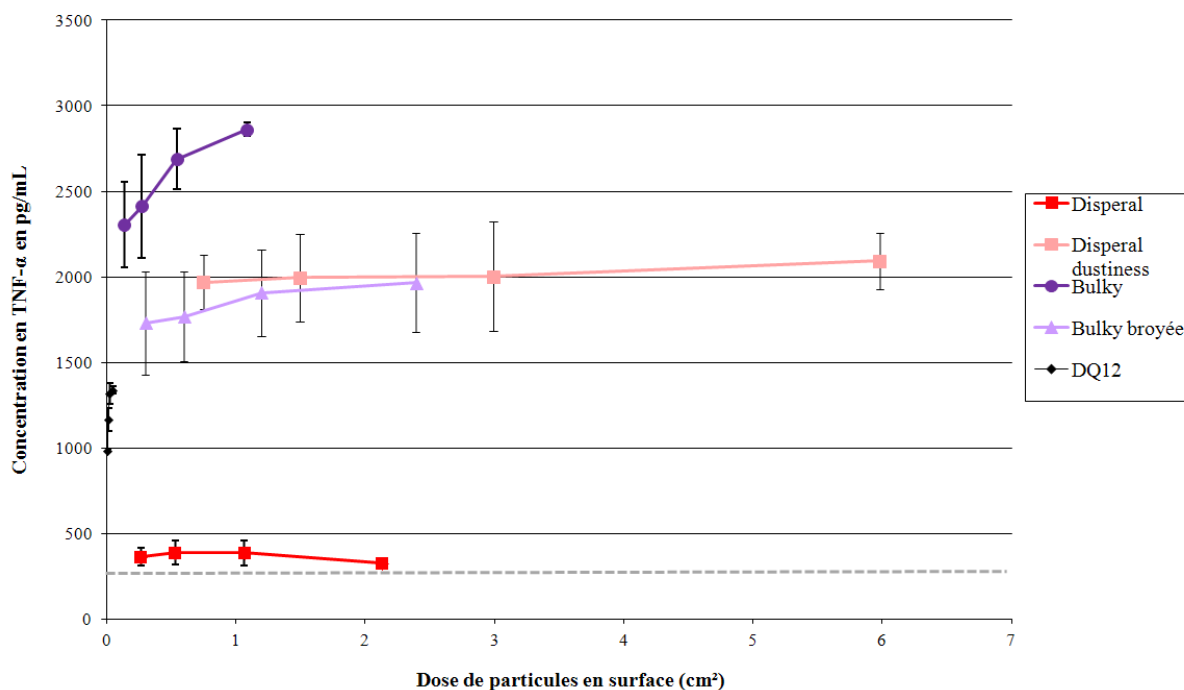
**Figure 105 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA,  $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Pour une même dose de particules les résultats obtenus pour les particules « traitées » par rapport aux particules brutes montrent des résultats très différents (Figure 105). Les particules disperal « dustiness » entraînent une production de TNF- $\alpha$  cinq fois plus importante ( $\approx 2000 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) que les particules disperal brute ( $\approx 400 \text{ pg.mL}^{-1}$ ). Cette différence pourrait être due à la taille des agglomérats qui est fortement diminuée dans le cas des particules de disperal « dustiness » par rapport à la disperal brute.

Au contraire le broyage a entraîné pour les particules de bulky une légère diminution de la concentration de TNF- $\alpha$  ( $\approx 1900 \text{ pg.mL}^{-1}$  pour les particules broyées et  $2900 \text{ pg.mL}^{-1}$  pour les particules brutes). Les particules avant et après traitement ayant la même composition

chimique et une taille de cristallites identique, la différence de réponse est attribuée à un effet de la taille des agglomérats.

Les particules de bulky broyée montrent une relation de dose-dépendance contrairement à la disperal « dustiness ».



**Figure 106 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3)**

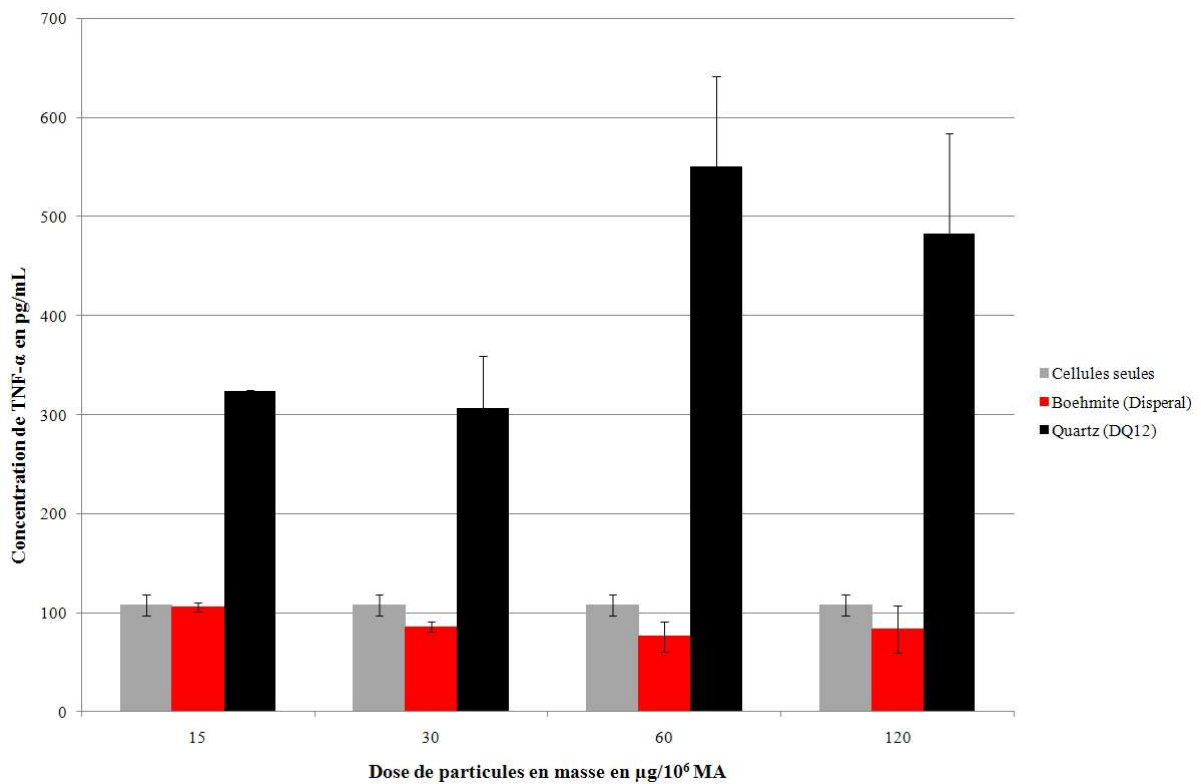
Lorsque les résultats sont interprétés en fonction de la surface, l'activité entre les particules de disperal et de disperal « dustiness » est également très différente. En effet nous constatons une réponse quatre fois plus élevée pour une surface identique pour la disperal « dustiness » par rapport à la disperal « brute », en accord avec les résultats précédents donnés en fonction de la masse. Comme il n'y a pas d'effet d'impuretés ou de taille de cristallites, en ce qui concerne les particules de disperal et de disperal « dustiness », la différence significative induite sur le niveau de production en TNF- $\alpha$  peut s'expliquer par la différence de taille des agglomérats.

#### IV.1.1.3.2. Dosage de cytokines par la technologie Luminex

L'utilisation du Luminex (II.2.2.5) a eu pour intérêt de mesurer plusieurs cytokines en même temps. Nous avons choisi de doser le TNF- $\alpha$  (qui sera utilisé ultérieurement comme point de comparaison) par rapport à notre dosage classique ELISA, ainsi que d'autres cytokines d'intérêt pour notre problématique telles qu'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 et IFN- $\gamma$ .

Les résultats obtenus avec la technologie Luminex sont représentatifs d'une seule analyse et ont été réalisés avec un seul type de particules (la dispersal). Ces tests avaient pour objectif principal de déterminer l'éventuelle participation d'autres cytokines pro-inflammatoires lors des contacts entre les particules de boehmite et les cellules (RAW264.7).

#### TNF- $\alpha$



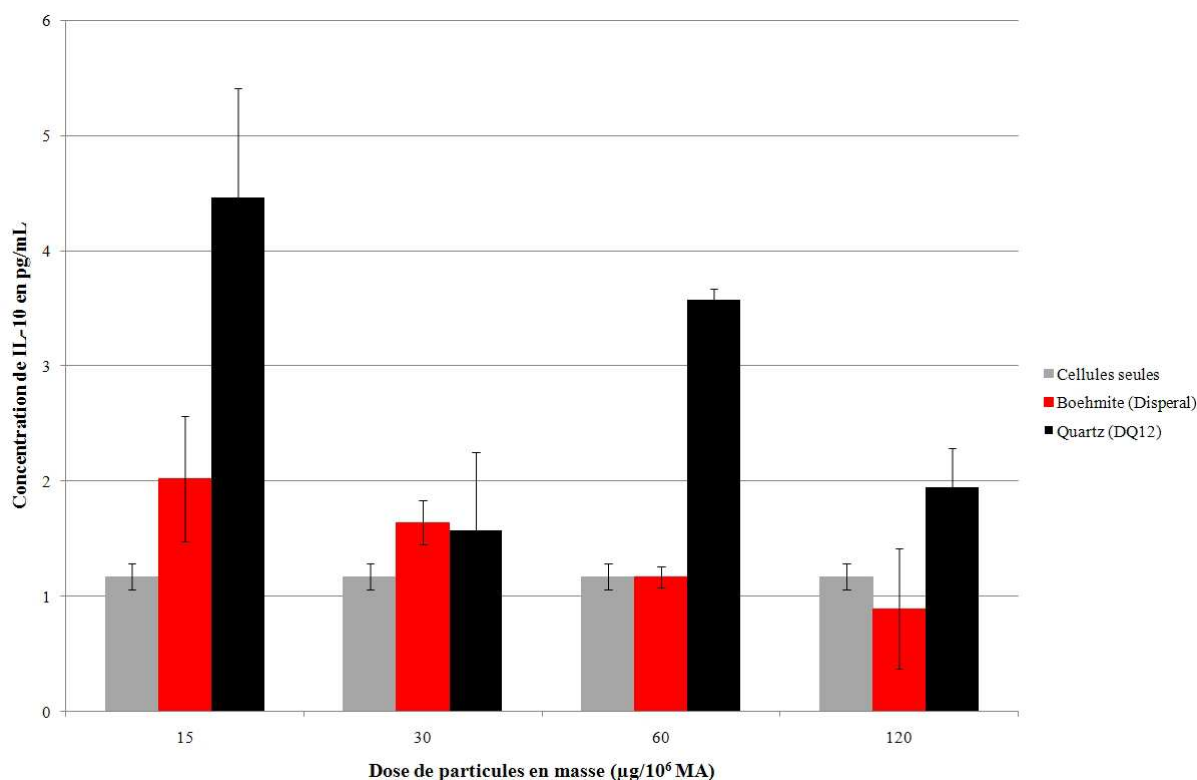
**Figure 107 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose de particules en masse (Luminex) après 24h d'incubation**

Les résultats obtenus pour le TNF- $\alpha$  dosé par la méthode Luminex (Figure 107) comparés aux résultats obtenus par un dosage ELISA classique (Figure 103) montrent une différence de valeur significative (facteur 3). Par ailleurs c'est avec la technologie Luminex qui est censée être plus sensible que le dosage ELISA, que les valeurs les plus faibles ont été obtenues.

L'hypothèse qui peut être faite est que la présence résiduelle de particules dans le surnageant puisse interférer avec la technologie Luminex au niveau des billes fluorescentes.

Cependant nous notons un profil de concentration en TNF- $\alpha$  similaire entre les cellules mises au contact de la boehmite et les cellules seules (témoin négatif de toxicité).

#### IL-10



*Figure 108 : Concentration d'IL-10 en pg/mL en fonction de la dose en masse de particules*

Les résultats obtenus montrent la présence d'IL-10 en très faible quantité. En présence de la boehmite une production maximale de 2pg/mL d'IL-10 a été observée. Seule cette cytokine semble avoir une production stimulée par la boehmite et par le quartz DQ12. Il ne semble pas y avoir de production d'interféron- $\gamma$ , d'IL-1 et d'IL-6.

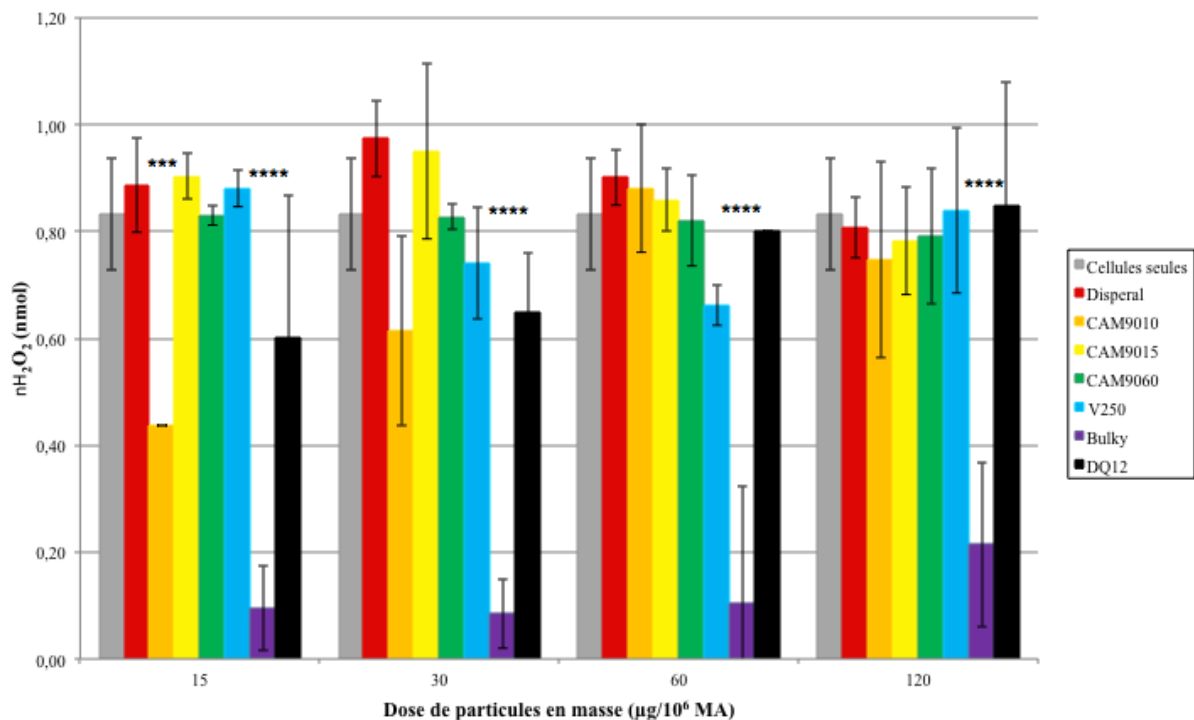
Ces résultats peuvent être sous-estimés de la même façon que pour le TNF- $\alpha$ . En effet la présence résiduelle de particules dans le surnageant peut interférer avec la technologie Luminex au niveau des billes fluorescentes. Ce qui est sûrement le cas pour la boehmite qui montre une relation de dose-dépendance inverse, ainsi que pour le témoin positif de toxicité qui montre une réponse incohérente selon les doses.

Les résultats obtenus sur une seule expérience tendent à confirmer la participation prédominante du TNF- $\alpha$  comparée à ces autres cytokines que nous n'avons de ce fait pas évaluées dans la suite de nos expérimentations.

#### IV.1.1.4. Stress oxydant : $H_2O_2$

Le stress oxydant provoqué par les particules de boehmite sur les macrophages est évalué par le dosage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) libéré dans le surnageant de culture. Le peroxyde d'hydrogène est un facteur important du stress oxydant. Le quartz DQ12 est décrit comme étant moins actif sur ce type de paramètre biologique (Bruch 2004). Nous avons observé en effet une différence de peroxyde d'hydrogène libéré peu importante entre les témoins positif et négatif de toxicité ce qui n'empêche pas l'interprétation des résultats obtenus avec les particules de boehmite.

##### IV.1.1.4.1. *Stress oxydant aigu (ROS) :*

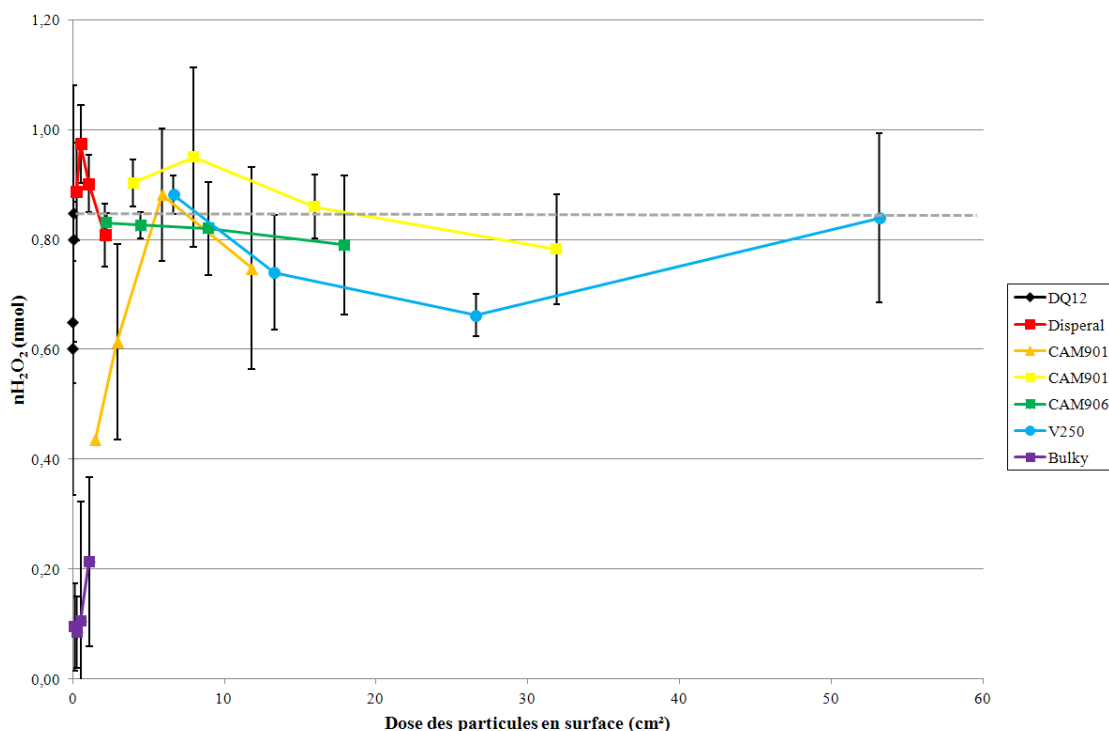


**Figure 109 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de  $H_2O_2$  en fonction de la dose de particules brutes exprimée en masse après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Nous observons des résultats très proches pour les témoins négatifs ( $nH_2O_2=0,85\text{nmol}$ ) et positifs ( $nH_2O_2$  compris entre 0,60 et 0,80nmol) de toxicité. Par ailleurs nous rappelons que le témoin positif de toxicité est connu pour ne pas générer un stress oxydant significatif (Bruch

2004). Les résultats obtenus (Figure 109) montrent une activité biologique dont l'intensité dépend de la nature des particules. En effet après une interaction de 90 minutes entre les cellules et les macrophages nous observons des comportements très différents en fonction des particules. Le stress oxydant aigu est pratiquement nul pour les particules de bulky ( $nH_2O_2=0,2$  nmol), la réponse est étonnamment, largement en dessous du témoin négatif de toxicité ( $nH_2O_2=0,8$  nmol). Il y a donc un effet inhibiteur des particules de bulky sur le stress oxydant. Nous pourrions penser à une possible interférence de l'enzyme (la horseradish peroxidase) ou de la scopolétine. Cependant cette hypothèse est écartée car elle se produirait pour l'ensemble des particules. Il s'agit peut être d'un phénomène d'adsorption des particules de bulky dépendant de ses caractéristiques physicochimiques, mais nous n'avons pas assez d'éléments pour conclure sur ce phénomène.

En ce qui concerne les autres particules, le signal devient important mais reste toutefois du même ordre de grandeur que celui du témoin négatif de toxicité ( $0,8\text{nmol} < nH_2O_2 < 1$  nmol). Ceci nous amène à la conclusion qu'après 90 minutes d'incubation, les cellules au contact des différentes particules de boehmite ont un niveau de stress oxydant équivalent aux cellules témoins.

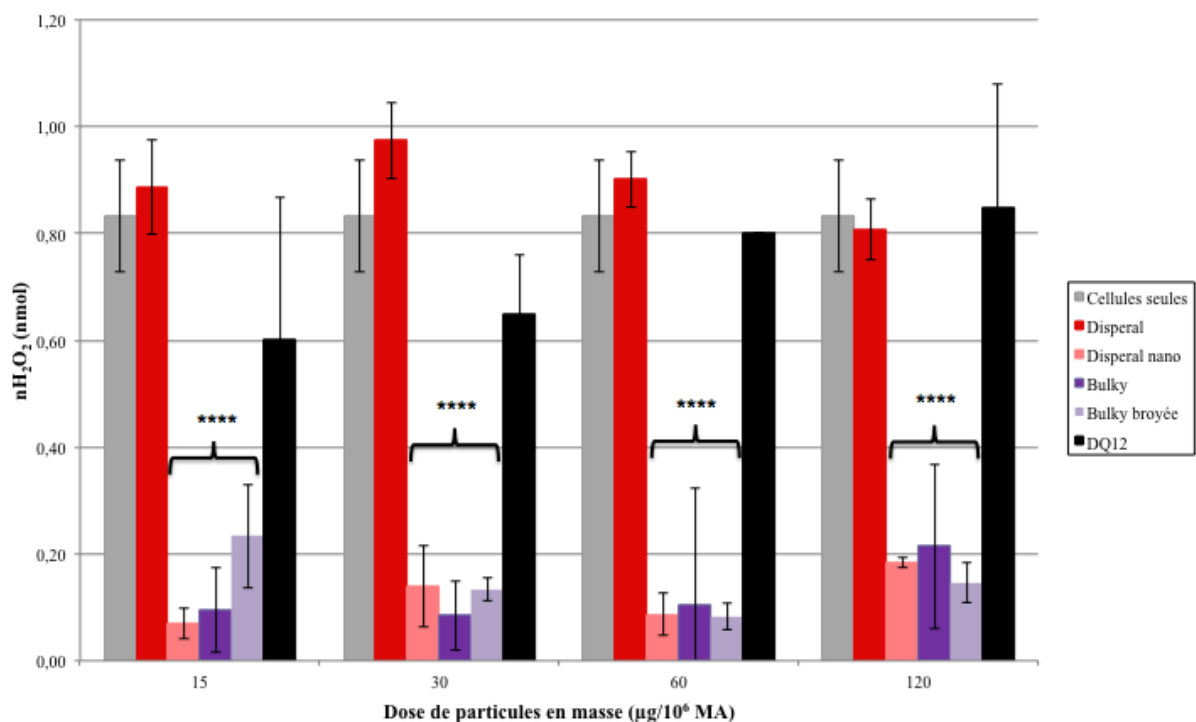


**Figure 110 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de  $H_2O_2$  en fonction de la dose de particules brutes exprimée en surface après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**



Les résultats exprimés en fonction de la dose en surface sont relativement proches pour les différentes particules hormis pour les particules de bulky qui sont largement en dessous, les résultats sont donc similaires à ceux représentés en masse, il n'y a donc pas d'effet de la surface. Nous constatons qu'en terme de masse, la dose la plus élevée pour les particules de bulky correspond à la plus faible pour les autres particules. L'effet des particules de bulky est quatre fois moins élevé que les autres particules et ceci pour une même surface. Il y a donc un effet taille de cristallites, des particules agglomérées ou de composition chimique puisque ce sont les deux caractéristiques différentes des autres poudres. Ces résultats de stress aigue sont en accord avec les données de RPE obtenus par ailleurs et présentés dans la partie physicochimie.

Les résultats suivant représentent spécifiquement le stress oxydant aigue pour les particules de dispersal « dustiness » et de bulky broyée.



**Figure 111 : Stress oxydant aigue (ROS) en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

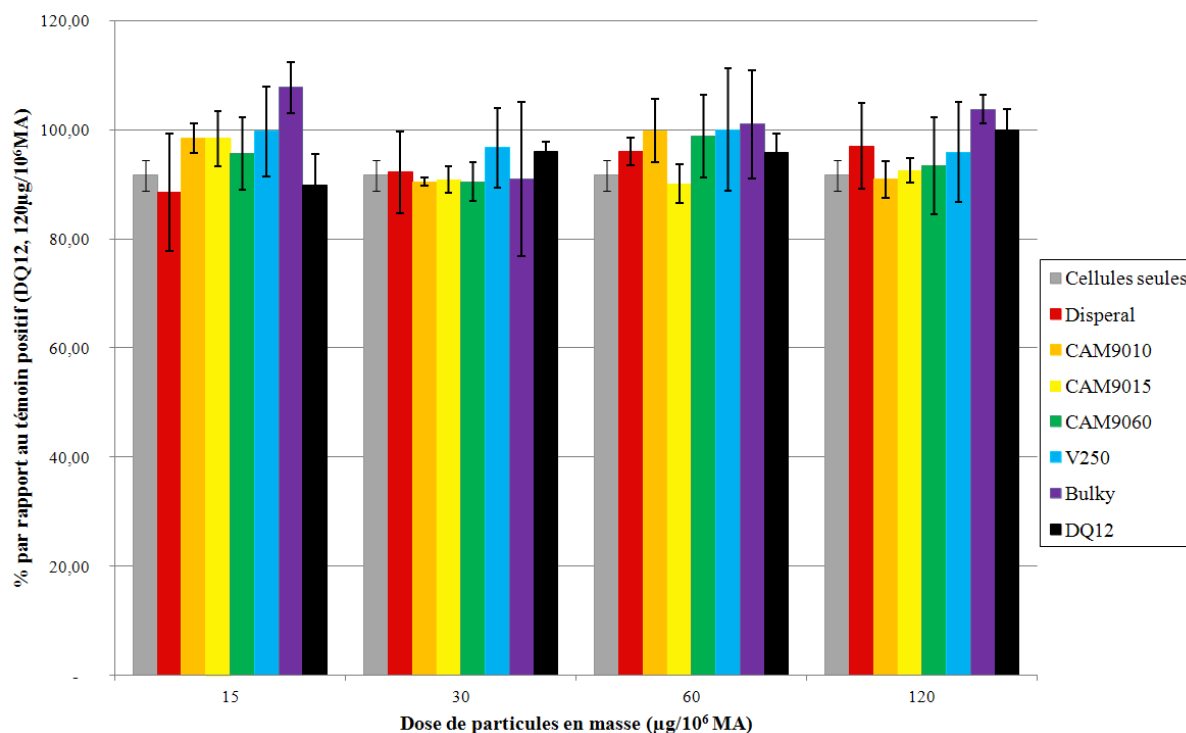
Les résultats obtenus pour les témoins positifs (nH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=0,80nmol pour la plus forte dose) et négatifs (nH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=0,85nmol) de toxicité sont très proches, le DQ 12 n'induisant pas une production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le stress oxydant aigue mesuré après 90 minutes de contact est très faible pour les particules de dispersal « dustiness » (0,08 à 0,18 nmol) par rapport aux particules de

disperal brute 0,8 à 0,95 nmol). En ce qui concerne les deux types de particules de bulky nous retrouvons approximativement les mêmes résultats, il en de même si nous comparons les résultats obtenus pour les particules de disperal « dustiness » et particules de bulky broyée. Nous pouvons donc dire qu'après 90 minutes les particules montrent un stress oxydant pratiquement nul alors que la disperal « brute » montre un stress oxydant normal puisque même niveau que le témoin négatif de toxicité.

La taille a donc une incidence sur le stress oxydant, en effet les résultats montrent qu'après diminution de la taille des agglomérats, le stress oxydant diminue fortement pour la disperal « dustiness ». En ce qui concerne la bulky et la bulky broyée les résultats obtenus sont proches et restent très inférieurs au témoin négatif de toxicité.

#### IV.1.1.4.2. Stress oxydant chronique (TOX) :

Le stress chronique est mesuré après 24h de contact entre les particules et les cellules en condition particulière de stimulation. Les résultats sont représentés, d'après la méthode de Bruch (Bruch 2004), en pourcentage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport au témoin positif (quartz DQ12) fixé à 100%.

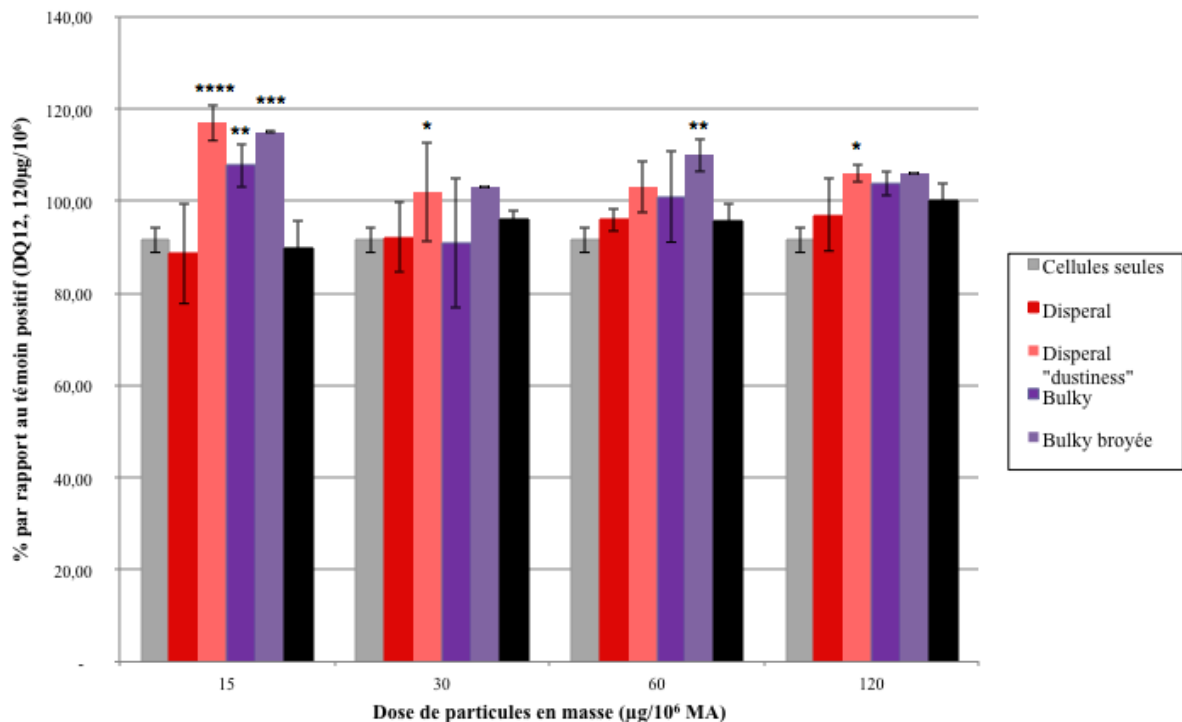


**Figure 112 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose de particules brutes exprimée en masse après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Pour les différentes particules nous observons un niveau de stress modéré avec des résultats ne dépassant que très rarement les 100% qui est représentatif du niveau du témoin positif de toxicité. Les particules de boehmite étudiées ne semblent donc pas avoir d'effet stress oxydant chronique notable.

Nous observons une relation dose dépendante pour le DQ12 (ROS et TOX). Les résultats convertis en surface ne montrent aucun effet de la surface sur le stress oxydant.

Les résultats suivants représentent en particulier le stress oxydant chronique pour les particules de dispersal « dustiness » et de bulky broyée.



**Figure I13 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Le stress oxydant mesuré après 24h de contact apparaît modéré pour les différentes particules étudiées, du même ordre de grandeur que le témoin positif de toxicité qui est connu pour ne pas induire de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

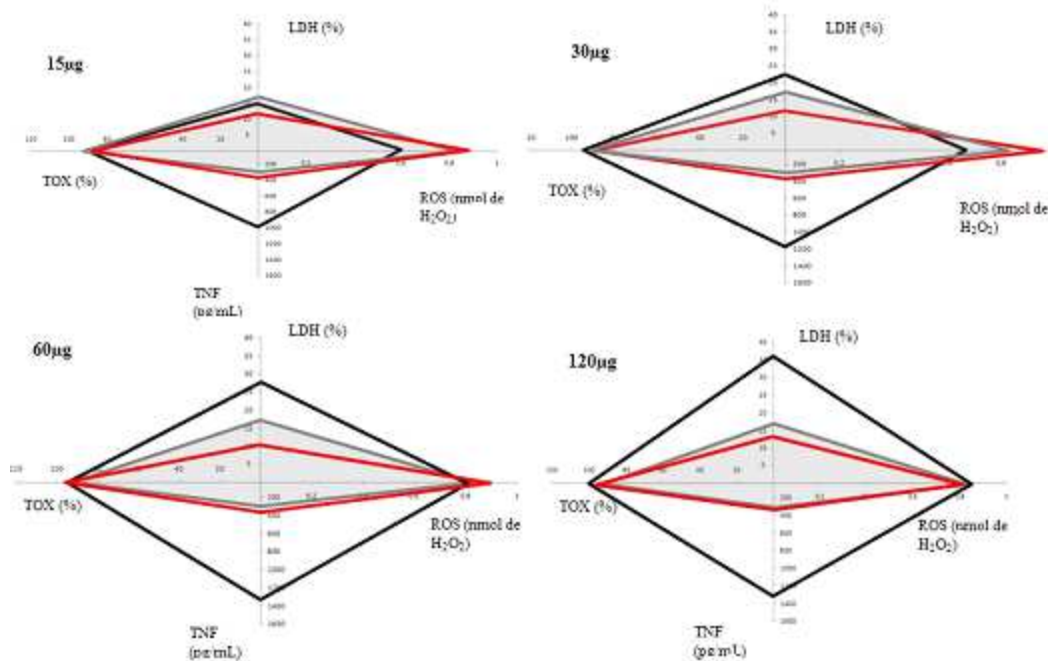
Les résultats convertis en surface ne montrent encore une fois aucun effet de la surface sur le stress oxydant (Annexe C, Figure 162).

### IV.1.2. Evolution globale de l'activité biologique

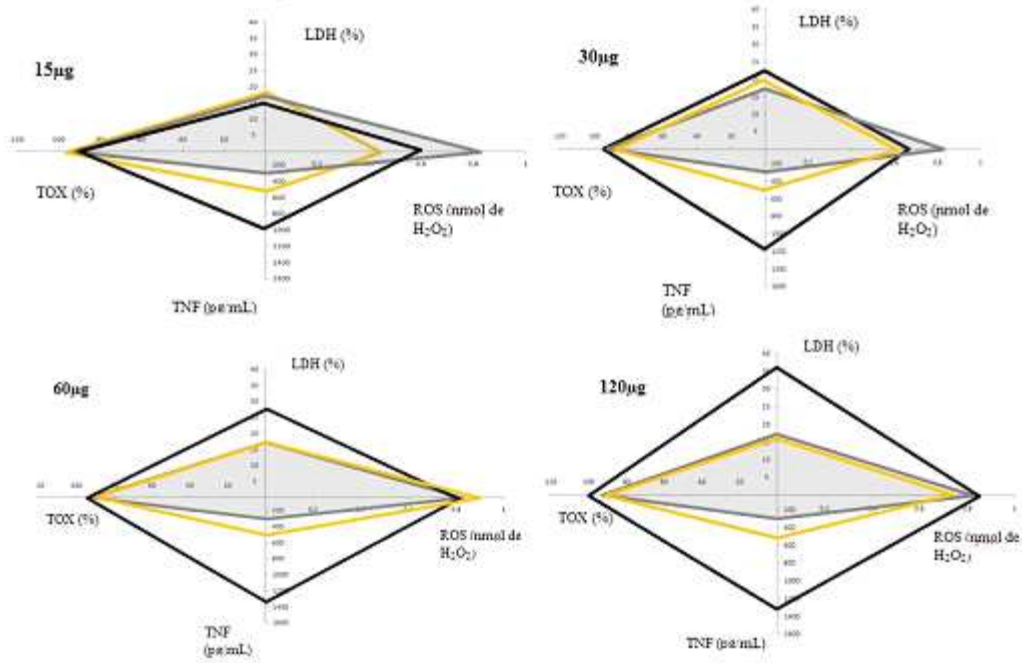
Les différents paramètres de l'activité biologique ont été étudiés indépendamment. Suite à cela nous avons choisi d'exprimer l'ensemble de nos évaluations biologiques selon un modèle vecteur qui consiste à reporter sur les 4 axes les résultats obtenus pour les différents paramètres de l'activité biologique étudiés précédemment :

- le TNF- $\alpha$  pour la réponse inflammatoire,
- la LDH pour l'endommagement et la mort cellulaire,
- le ROS et le TOX respectivement pour le stress oxydant aigu et chronique par dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

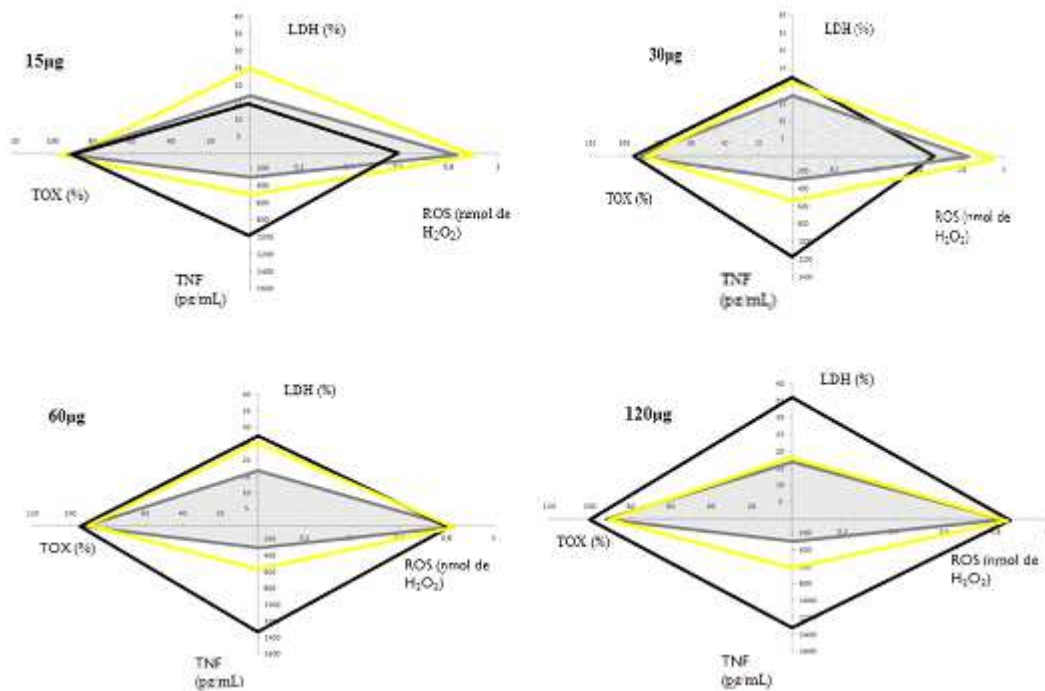
L'objectif est d'avoir une vue synthétique et globale de l'activité biologique en fonction des quatre paramètres évalués.



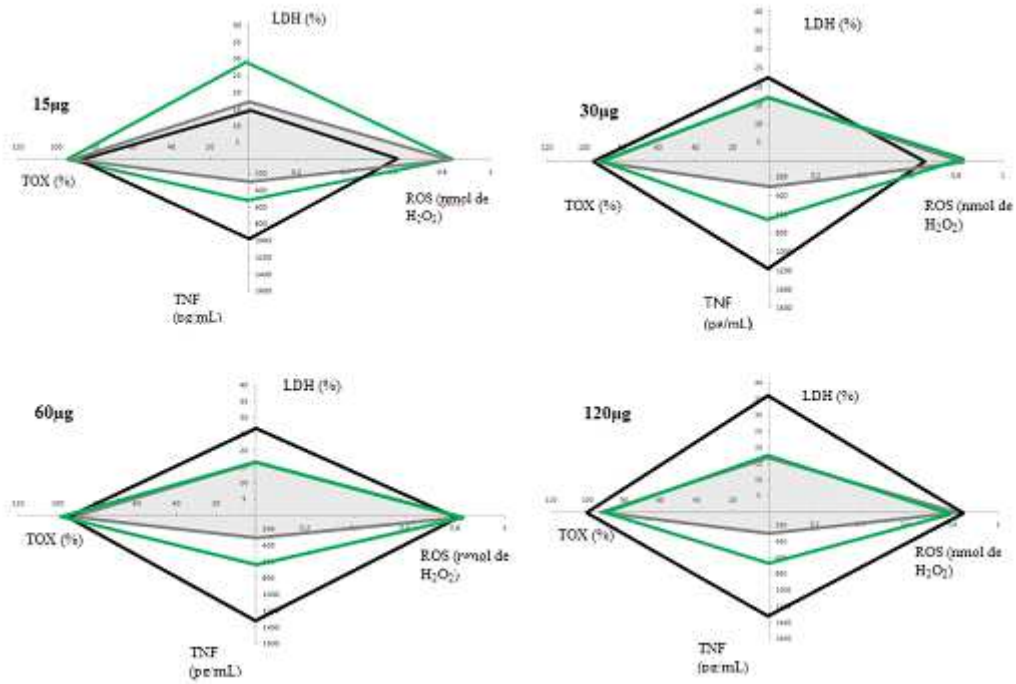
**Figure 114 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de disperal par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**



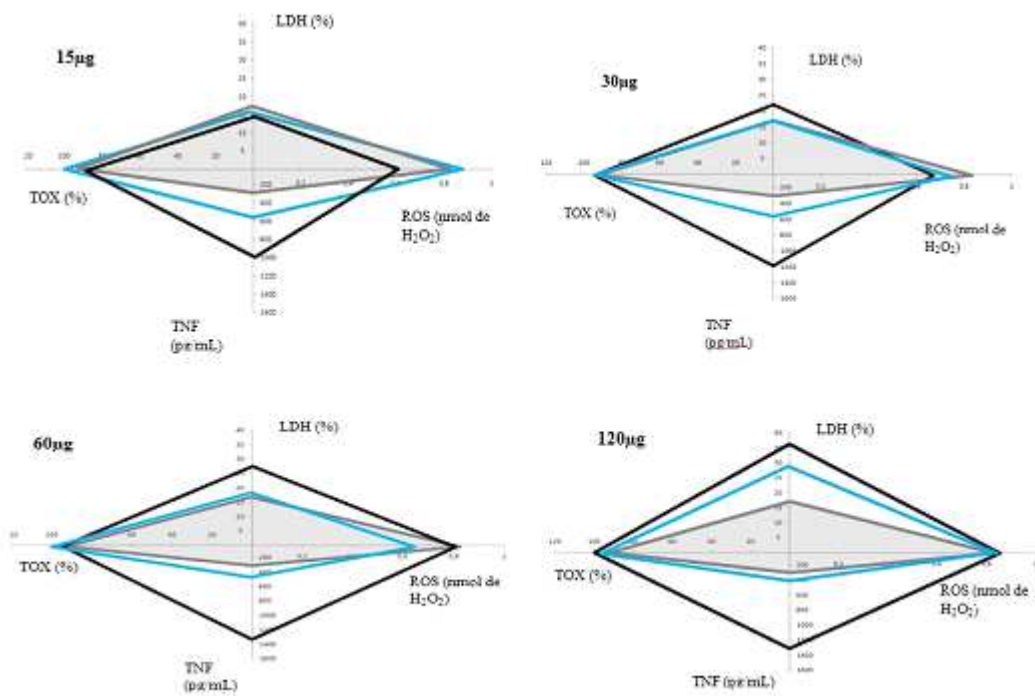
**Figure 115 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de CAM9010 par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**



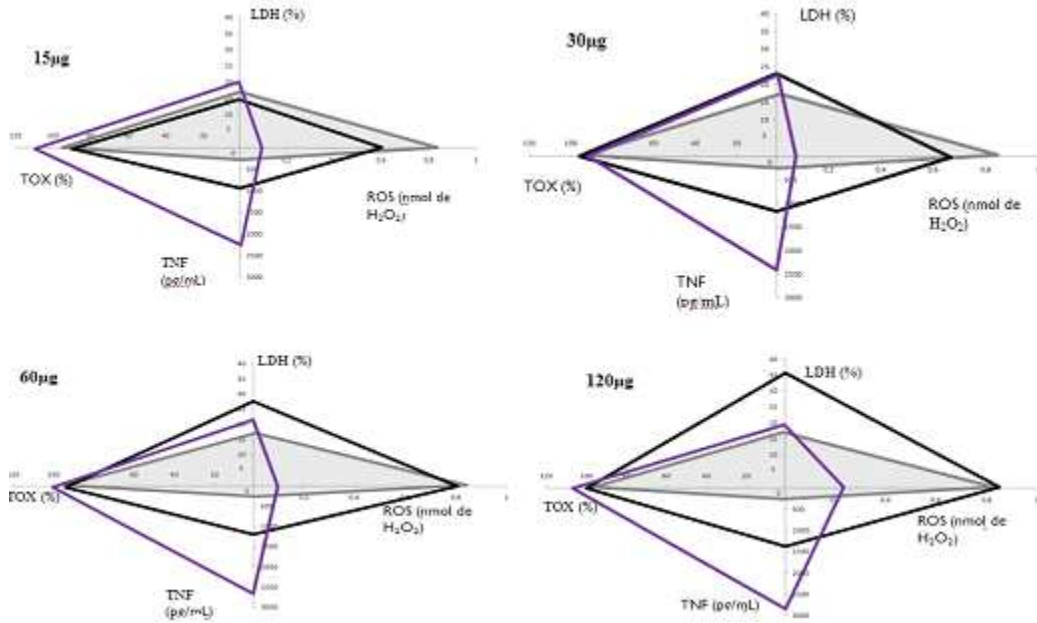
**Figure 116 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de CAM9015 par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**



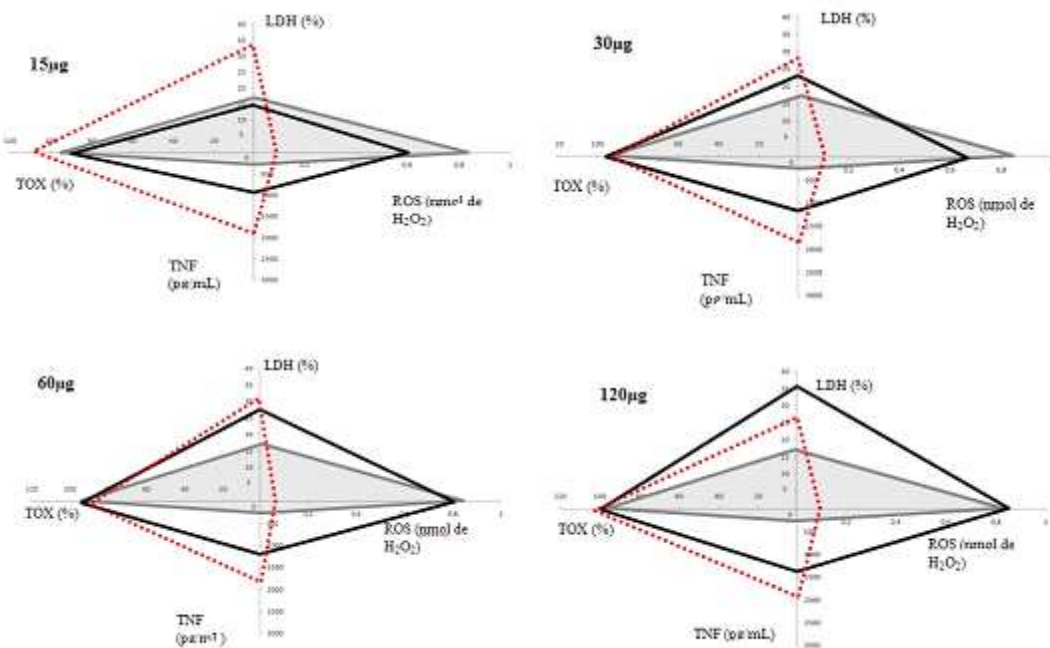
**Figure 117 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de CAM9060 par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**



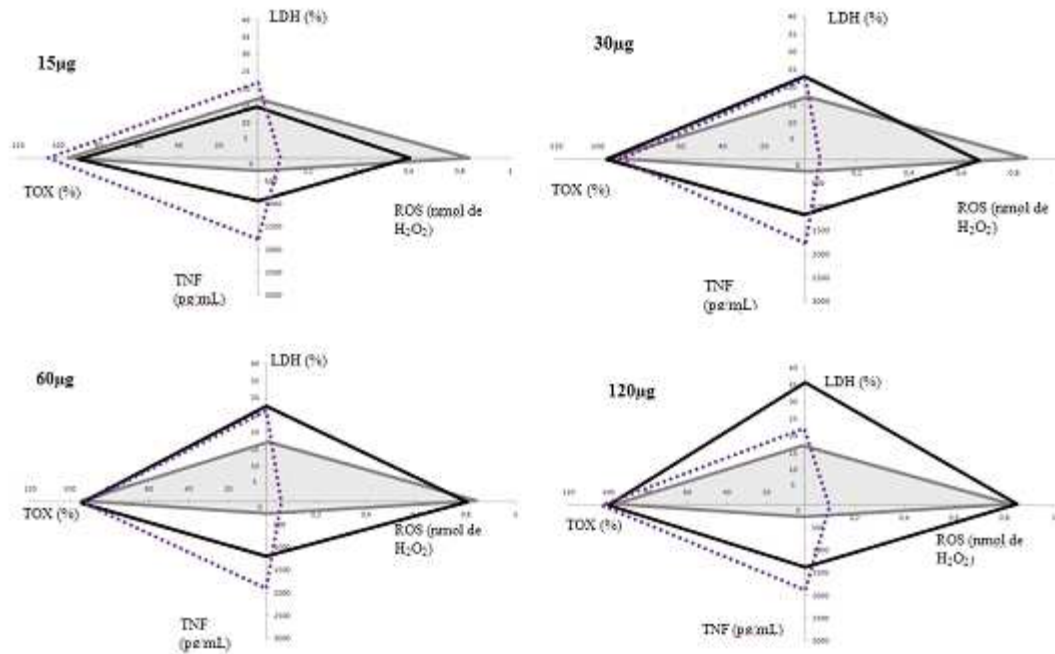
**Figure 118 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de V250 par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**



**Figure 119 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de bulky par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**



**Figure 120 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de dispersal « dustiness » par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**



**Figure 121 : Evolution de l'activité biologique globale de particules de bulky broyée par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**

Les résultats du modèle vecteur permettent de regrouper les 4 paramètres sur un même graphique. Ils font ressortir des différences dans l'évolution de l'activité biologique des différentes particules étudiées.

- Particules de boehmite disperal, CAM9010, CAM9015, CAM9060, V250 (Figures 114 à 118):

Ces poudres présentent une activité biologique globale modérée. En effet, quelque soit la dose, l'évolution du quadrilatère est relativement proche de celui des cellules seules qui représentent le témoin négatif de toxicité. Elles se sont caractérisées par un stress oxydant similaire au témoin cellules seules et une absence de cytotoxicité et un effet inflammatoire plus marqué.

- Particules de disperal « dustiness », bulky et bulky broyée (Figures 119 à 121) :

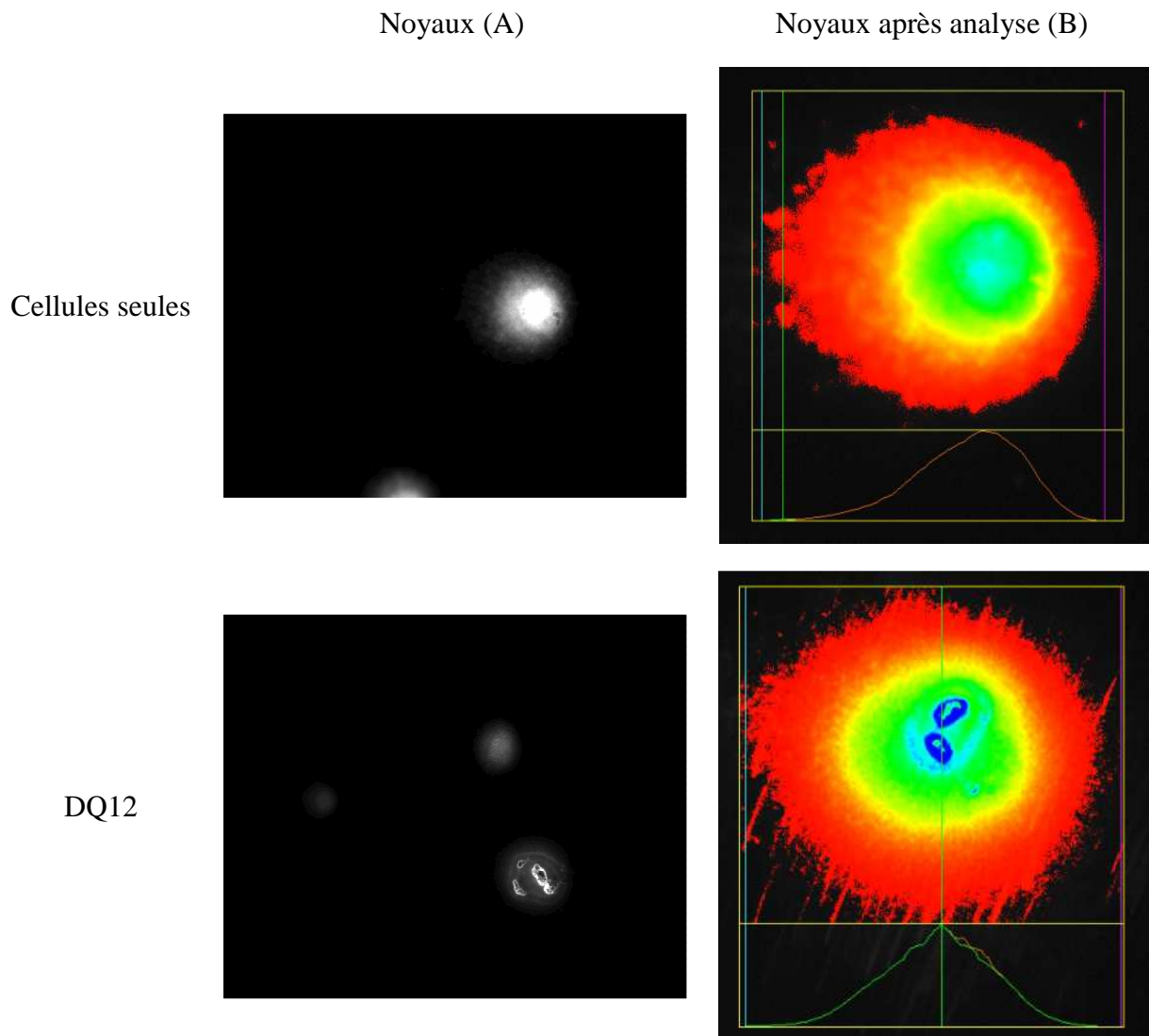
Ces poudres semblent avoir par rapport aux poudres micrométriques un impact biologique nettement plus important, avec un allongement caractéristique des figures suivant l'axe vertical représentant l'inflammation et la cytotoxicité et au contraire une diminution du stress oxydant. Nous observons en outre des différences notables entre les particules avant et après traitement. Alors que la disperal brute ne présente aucun effet sur l'activité biologique, la disperal « dustiness » montre à la fois une cytotoxicité et un état d'inflammation important tout comme la bulky. Ces différences sont vraisemblablement à attribuer à un effet taille des agglomérats.



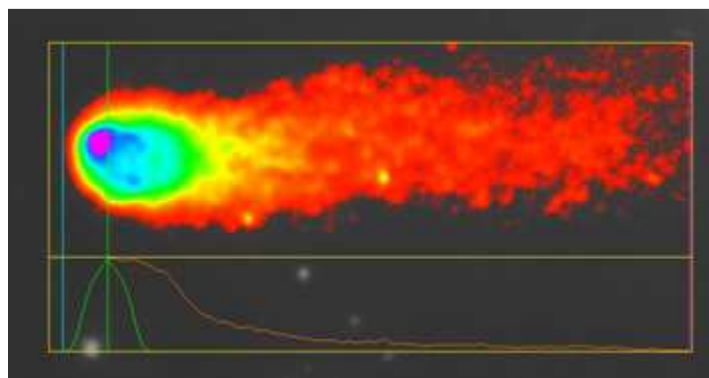
### IV.1.3. Génotoxicité

Le test des comètes permet de mesurer les dommages de l'ADN des cellules après contact avec les particules. Nous avons choisi d'évaluer sur la base des résultats précédents la poudre dispersal brute et dispersal « dustiness » et la poudre bulky, en comparaison au témoin négatif représenté par les cellules seules et le DQ12 témoin positif de toxicité. Nous avons aussi utilisé des cellules témoins lysées avec une solution aqueuse de Triton X-100 à 9% comme contrôle positif interne de la technique. Pour les différents échantillons nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que lors de nos tests biologiques en utilisant la dose en masse la plus élevée (120µg/1million de MA).

Les analyses ont abouti aux observations suivantes :

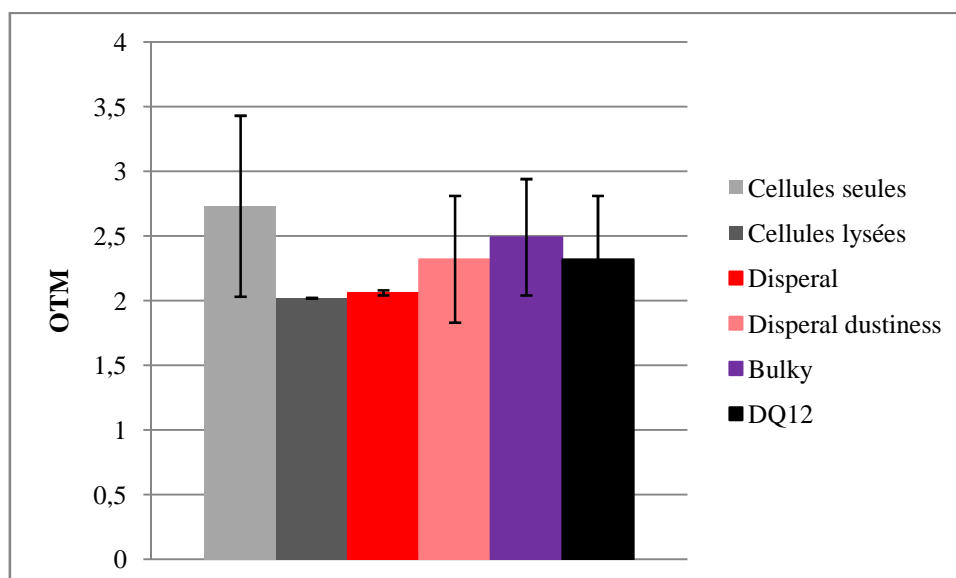


**Figure 122 :** (A) Photo en épifluorescence de noyaux (lignée RAW 264.7) après contact avec les témoins positifs et négatifs de toxicité (X60), (B) analyse des noyaux par le logiciel « Comet Assay IV, présence de particules de DQ12 au sein du noyau »



**Figure 123 :** Photo en épifluorescence d'un noyau « profil comète » (lignée RAW 264.7) après contact avec le témoin positif de toxicité (DQ12) (X60), analyse des noyaux par le logiciel « Comet Assay IV »

Les analyses des différents échantillons ont révélé peu de noyaux avec un profil comète type, suggérant un effet génotoxique limité, les noyaux ne sont en effet pas lésés quelles que soient les conditions. Les résultats ont ensuite été traités et l'olive tail moment (OTM, exprimé en % d'ADN par  $\mu\text{m}$ , c'est le produit du pourcentage d'ADN réparti dans la queue de la comète par la distance tête queue) a été représenté sur le graphique suivant (Figure 124).



**Figure 124 :** Représentation de l'olive tail moment (OTM) en fonction de l'échantillon étudié

Les résultats semblent assez proches, en effet il ne se distingue aucune tendance pour les différents échantillons.

En ce qui concerne le témoin cellules seules lysées, celui-ci est apparu non adapté à la problématique. Il est indispensable pour de futurs tests de mettre au point un tampon de lyse plus drastique qui permette réellement de lyser la membrane nucléaire et pas seulement la membrane plasmique.

Ces résultats permettent de conclure que la disperal, la bulky et le DQ12 n'entraînent pas de lésions significatives de l'ADN des macrophages dans nos conditions expérimentales.

De plus nous observons sur les clichés après contact avec le témoin positif de toxicité, le DQ12, la présence de particules au niveau du noyau. D'après la littérature c'est un phénomène assez rare, toutefois il arrive que des nanoparticules pénètrent dans le noyau et interagissent directement avec l'ADN (AFSSAPS 2011; Passagne 2011).

#### **IV.1.4. Conclusion intermédiaire**

Cette partie résume l'activité biologique des différentes particules industrielles de boehmite. En particulier l'état d'inflammation, la cytotoxicité et le stress oxydant. Certaines poudres ne montrent aucun effet significatif sur les divers paramètres cellulaires évalués, et d'autres semblent avoir un impact plus particulier sur un paramètre cellulaire donné. Par exemple les particules disperal ont un effet cytotoxique et un stress oxydant nul, ainsi qu'un effet inflammatoire modéré. Au contraire, les particules de bulky ont un effet inflammatoire extrêmement important alors que l'effet cytotoxique et le stress oxydant sont nuls. Cet impact est sans doute lié à un effet taille des agglomérats. En effet, la taille des agglomérats de particules de bulky mesurait plus de 2,2 $\mu$ m alors qu'après broyage, la taille avait diminuée et était comprise entre 100 et 2000nm. Les particules de disperal « dustiness » montrent une augmentation de la cytotoxicité et de l'état d'inflammation par rapport aux particules brutes. Ces résultats mettent en évidence un effet de la taille des agglomérats sur l'activité biologique.

Certaines particules ont des réponses importantes dans un domaine seulement, d'où l'intérêt de réaliser une analyse multiparamétrique de la toxicité biologique, tout en prenant en compte le phénomène d'adsorption des biomolécules à la surface des particules, pouvant modifier significativement les résultats obtenus (Chapitre V).

Le test permettant de mesurer le stress oxydant est un test difficile à mettre en œuvre et n'apportant pas de résultats très pertinents, il sera en perspective intéressant d'utiliser un test tel que l'OxiSelect™ ROS Assay Kit (Euromedex) qui possède l'avantage de mesurer une activité ROS générale (hydroxyles, peroxydes et autres espèces oxygénées réactives) dans les cellules et compléter plus spécifiquement avec une évaluation type glutathion.

Échantillons	Paramètres		
	Etat d'inflammation	Mort cellulaire	Stress oxydant
	TNF- $\alpha$	LDH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)
<b>Disperal</b>	+	-	-
<b>CAM9010</b>	+	-	-
<b>CAM9015</b>	+	-	-
<b>CAM9060</b>	+	-	-
<b>V250</b>	+	-	-
<b>Bulky</b>	++++	-	-
<b>Disperal « dustiness »</b>	++++	+++	-
<b>Bulky « broyée »</b>	++++	+++	-

		TNF- $\alpha$	LDH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Nul	-	<250 pg.mL <sup>-1</sup>	<20%	ROS : <0,8 nmol TOX : <100%
Modéré	+	Entre 250 et 500 pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 20 et 22%	
Important	++	Entre 500 et 900 pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 22 et 25%	
Très important	+++	Entre 900 et 1400pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 25 et 35%	
Extrêmement important	++++	>1400pg.mL <sup>-1</sup>	>35%	

**Tableau 21: Résumé de l'activité biologique des particules industrielles de boehmite**

L'absence de stress oxydant a été confirmée par l'incapacité des particules à former des radicaux libres. Les analyses RPE (III.1.9) sont donc indissociables des études sur l'activité biologique des cellules au contact des particules et ces observations confirment la nécessité de bien associer les données biologiques aux données physico-chimiques.

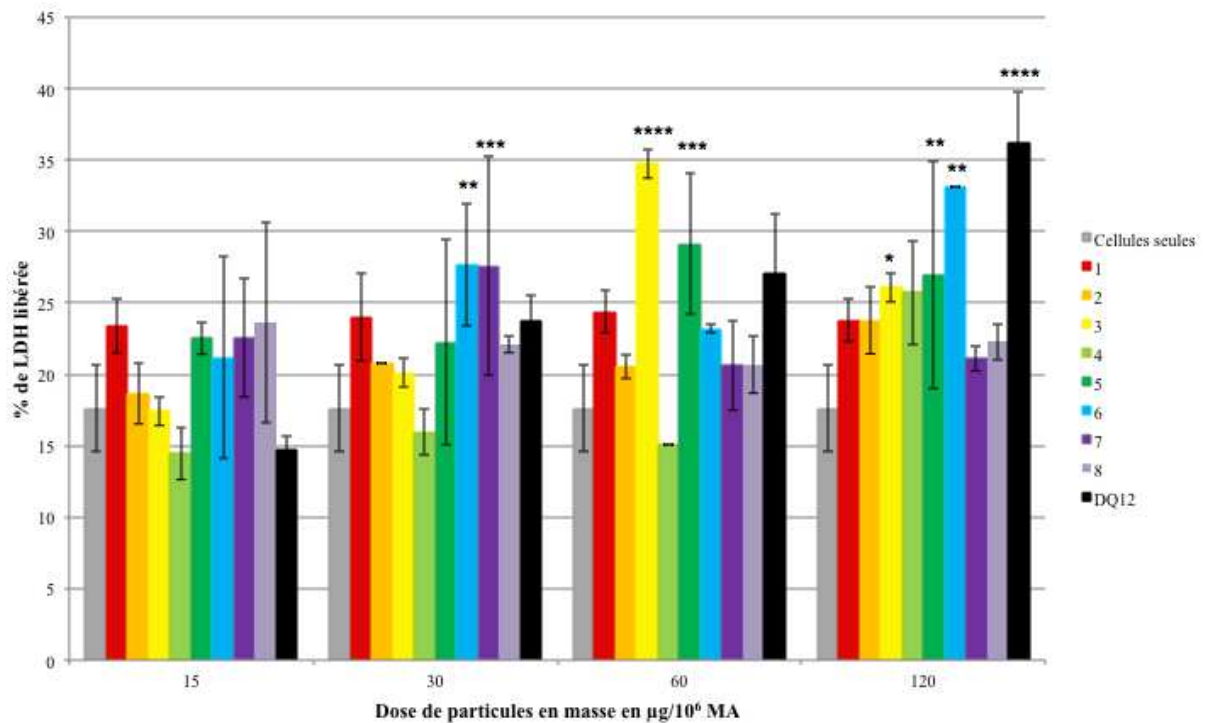
En définitif, les principales différences au niveau de la réponse biologique pour les différentes poudres peuvent être attribuées à l'influence de la taille des agglomérats des particules.

## IV.2. Activité biologique des particules élaborées par synthèse hydrothermale

### IV.2.1. Activité biologique des particules avant dispersion

Dans un premier temps les tests d'évaluation de l'activité biologique des particules ont été réalisés sur les particules brutes c'est-à-dire avant dispersion, selon les mêmes conditions expérimentales et méthodologiques que présentées pour la caractérisation des poudres industrielles.

#### IV.2.1.1. Perte d'intégrité membranaire



**Figure 125 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

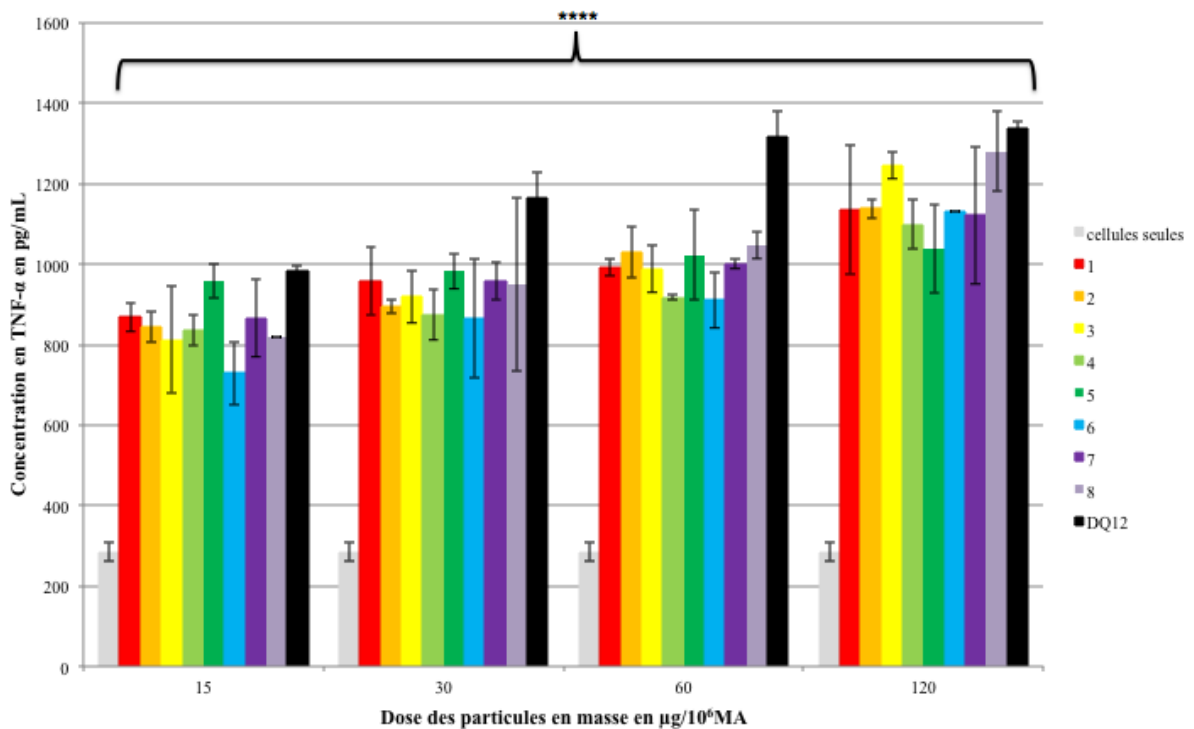
La perte d'intégrité a été mesurée par le pourcentage de LDH libérée (Figure 125). Nous observons un relargage de LDH entre 15 et 23% pour une dose en masse de 15 µg, ces taux sont supérieurs à celui du témoin positif de toxicité à cette même dose (%LDH<sub>Relarguée</sub> ≈ 15%). Or cette tendance s'inverse à la plus forte dose, le pourcentage de LDH libérée pour le témoin

positif de toxicité(%LDH<sub>Relarguée</sub> ≈ 36%) est alors supérieur à ceux obtenus pour les différentes particules(15% < %LDH<sub>Relarguée</sub> ≤ 34%).

Nous n’observons pas de différences significatives entre les particules étudiées si ce n’est pour les particules 3 et les particules 6 qui ont induit une perte d’intégrité membranaire plus importante que les autres poudres.

Les résultats exprimés en fonction de la dose en surface ne montrent pas particulièrement d’effet de la surface (Annexe C, Figure 163).

#### IV.2.1.2. Réaction inflammatoire



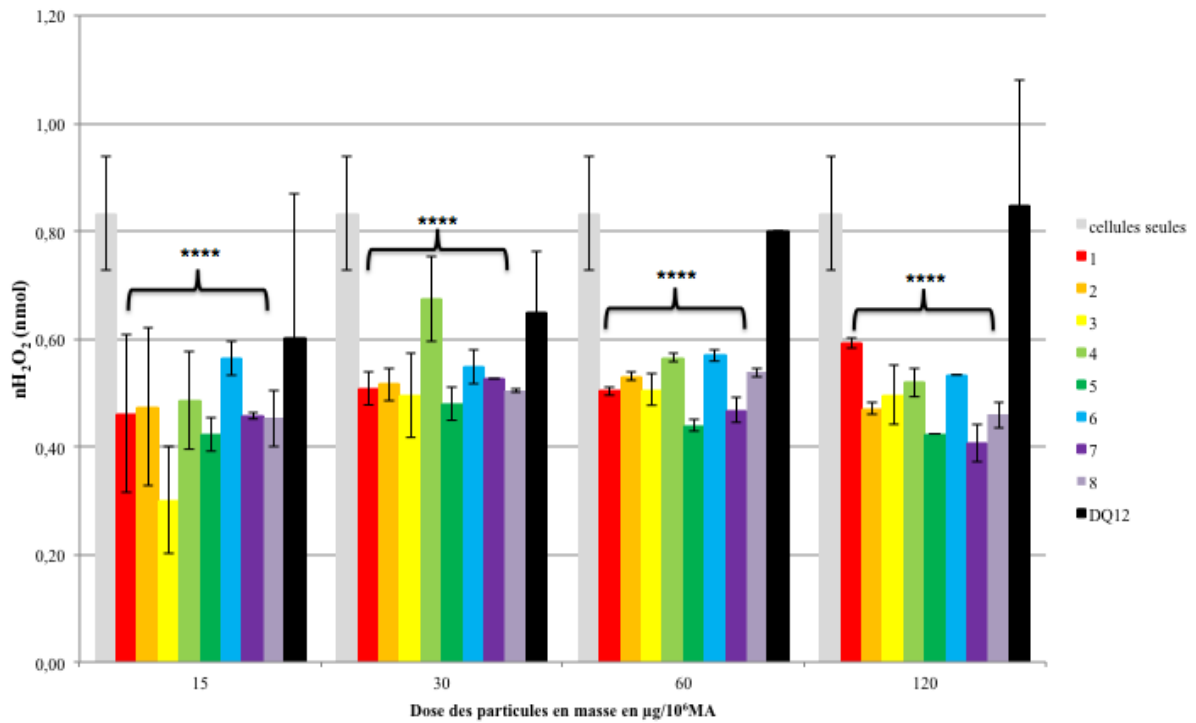
**Figure 126 : Concentration de TNF-α en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Les résultats obtenus en fonction de la dose en masse montrent une production en TNF-α importante (entre 800 et 1200 pg.mL<sup>-1</sup>) par rapport au témoin cellules seules (≈275 pg.mL<sup>-1</sup>), mais légèrement en dessous du témoin positif de toxicité (1300 pg.mL<sup>-1</sup>). Nous observons une relation de dose dépendance pour les différentes poudres.

Cependant nous n'observons pas de réelle différence entre les différentes poudres étudiées malgré des tailles de particules différentes.

Les résultats exprimés en fonction de la surface ne montrent pas d'effet de ce paramètre sur l'inflammation (Annexe C, Figure 164).

#### IV.2.1.3. Stress oxydant



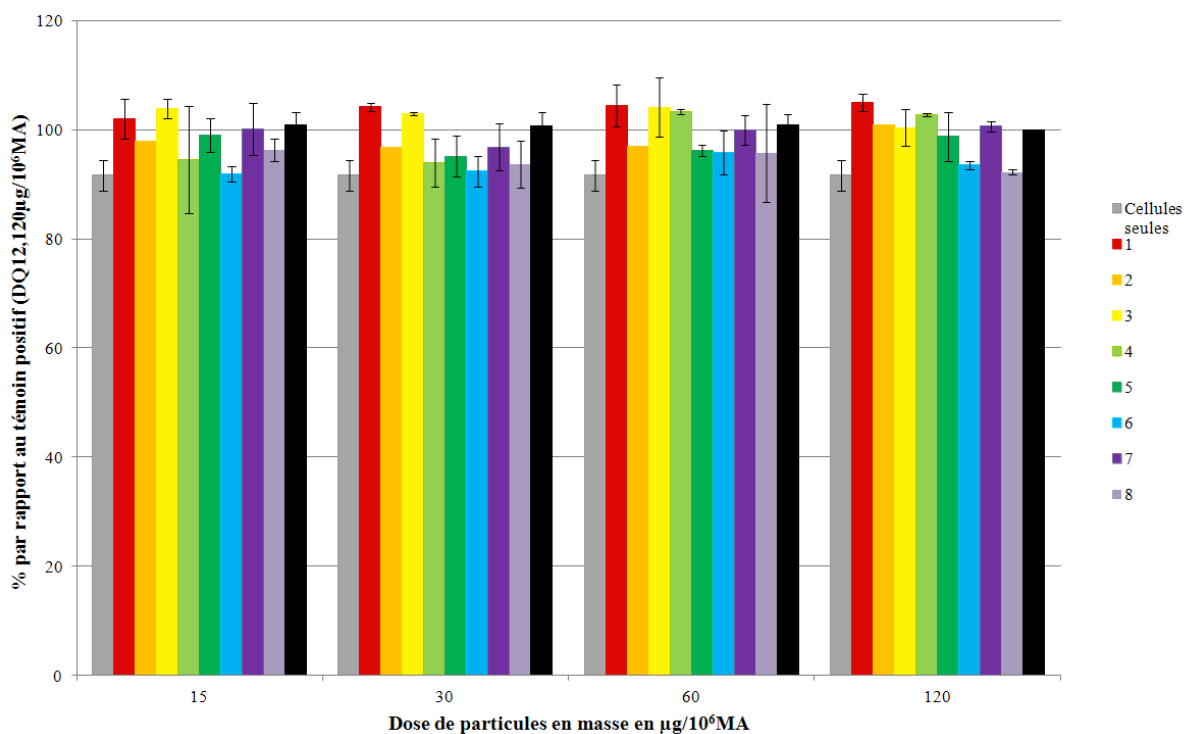
**Figure 127 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

L'évaluation du stress oxydant ( $n\text{H}_2\text{O}_2 < 0,60\text{nmol}$ ) pour les différentes particules élaborées par synthèse hydrothermale montrent des niveaux de ROS inférieurs aux témoins positifs ( $n\text{H}_2\text{O}_2 = 0,80\text{nmol}$  pour la plus forte dose) et plus étonnement aux témoins négatifs. Par ailleurs nous rappelons que le témoin positif de toxicité n'induit pas la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et atteint un niveau équivalent au témoin négatif de toxicité. Après 90 minutes, les particules n'induisent donc pas la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Il est tout de même surprenant que pour toutes les particules le niveau de ROS soit en dessous du témoin négatif de toxicité. Il se peut que les ROS générés s'adsorbent sur les

particules, entraînant un biais dans leur mesure et expliquant ainsi une quantité de ROS minimisée par rapport au témoin cellules seules.

Les résultats exprimés en fonction de la surface ne montrent pas un effet de la surface dans l'étude du stress oxydant (Annexe C, Figure 165).



**Figure 128 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Quelles que soient les particules de boehmite, le stress oxydant mesuré après 24h de contact est à un niveau comparable aussi bien au témoin cellules seules qu'au DQ12. Les particules de boehmite étudiées ne génèrent donc pas d'effet stress oxydant.

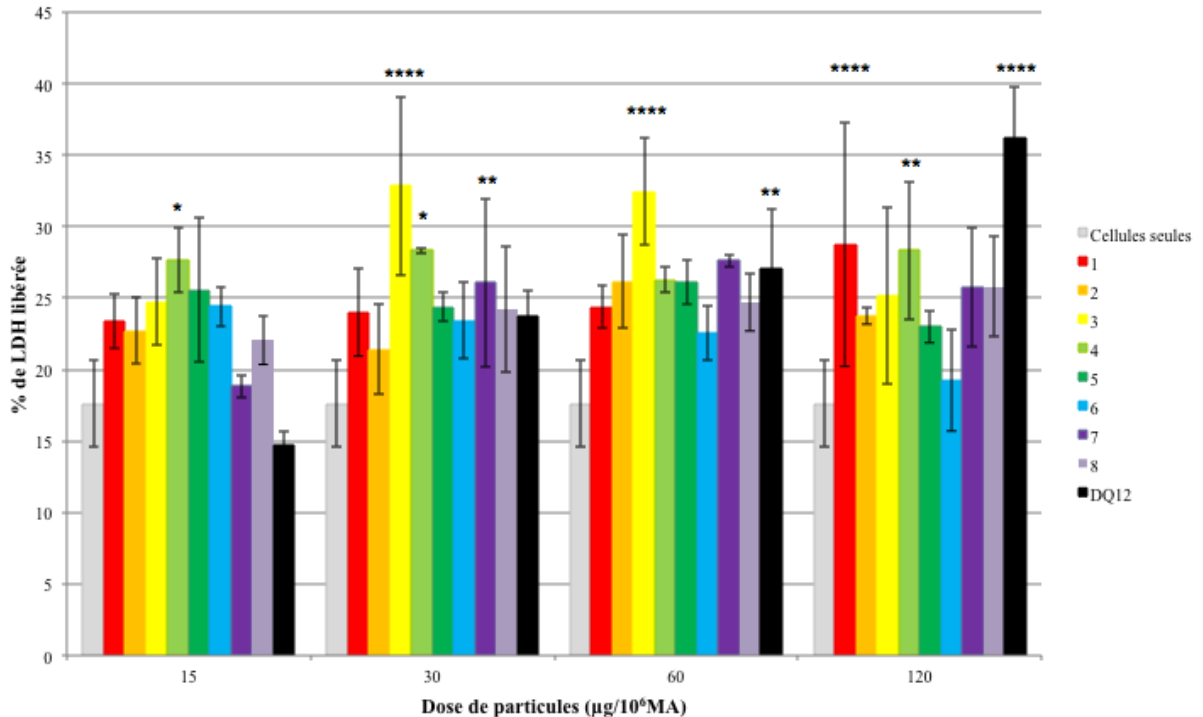
Une nouvelle fois les résultats exprimés en fonction d'une dose en surface ne montrent pas d'effet de la surface (Annexe C, Figure 166).



## IV.2.2. Activité biologique des particules après dispersion

Dans un deuxième temps nous avons évalué l'activité biologique des particules en utilisant les particules dispersées dans l'eau 1min à 300W par ultrasons.

### IV.2.2.1. Perte d'intégrité membranaire : LDH

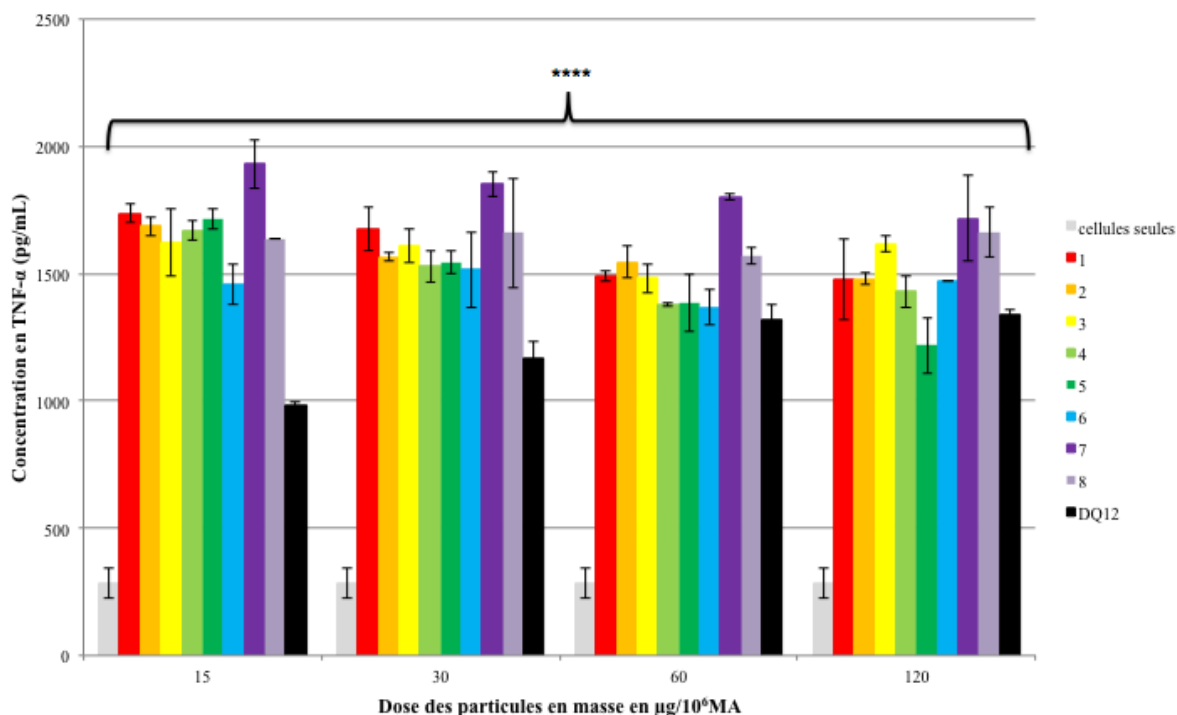


**Figure 129 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

En ce qui concerne la perte d'intégrité membranaire, les résultats obtenus sont importants (entre 20 et 35%) pour les différentes particules par rapport au témoin négatif de toxicité ( $11\% < \%LDH_{\text{Relarguée}} \leq 20\%$ ). Nous retrouvons la même tendance que précédemment avec à faible dose un pourcentage de LDH libérée supérieur au témoin positif ( $\%LDH_{\text{Relarguée}} \approx 36\%$ ) pour les différentes particules et à la plus forte dose de  $120 \mu\text{g}/10^6\text{MA}$  une inversion de tendance. Cependant les résultats sont supérieurs à ceux obtenus avec les particules non dispersées (15 à 23%) mais ne sont pas significativement différent hormis pour la poudre 4 ( $P<0,01$ ). Le seul paramètre ayant changé est la taille des particules, il y a donc un effet de la taille des agglomérats sur la cytotoxicité comme dans le cas des particules industrielles.

Les résultats exprimés en surface montrent des résultats dispersés et ne permettent pas d'établir un effet de la surface (Annexe C, Figure 167) et semblent plutôt confirmer l'hypothèse de l'effet de la taille des agglomérats.

#### IV.2.2.2. Réaction inflammatoire



**Figure 130 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

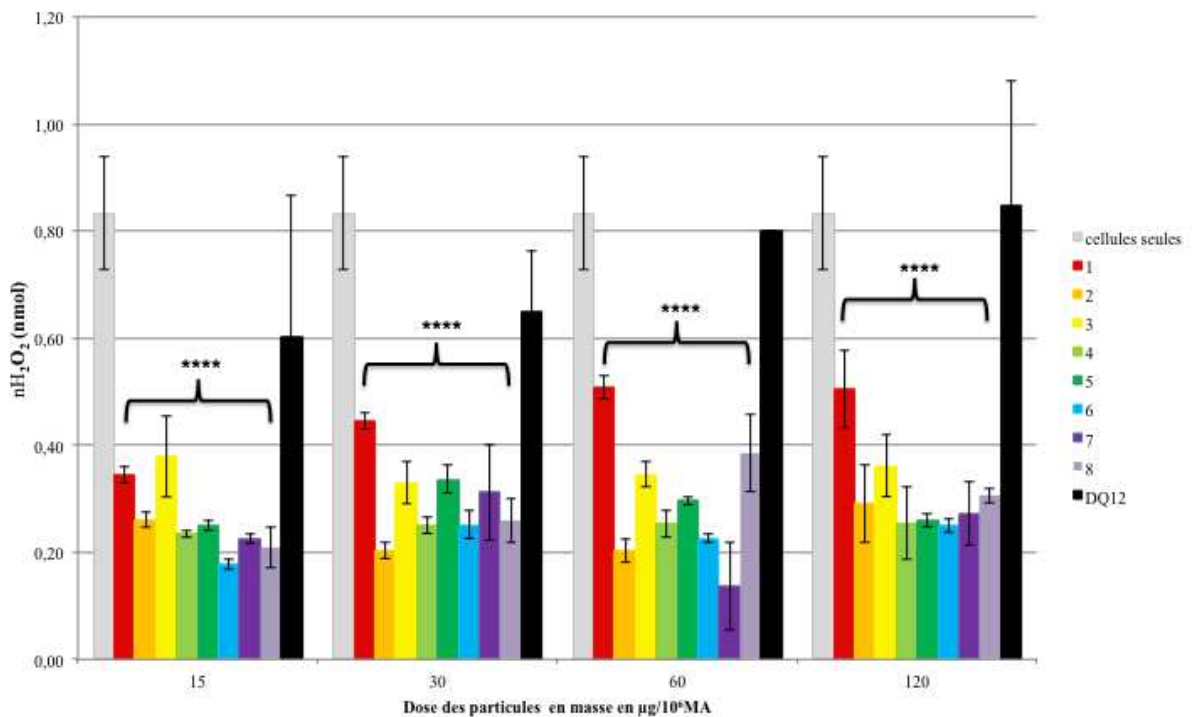
Les résultats obtenus montrent une réponse inflammatoire importante ( $[TNF-\alpha]>1400\text{pg.mL}^{-1}$  quelle que soit la dose) pour les différentes poudres synthétisées après dispersion, supérieures au témoin positif de toxicité ( $1300\text{pg.mL}^{-1}$  pour la plus forte dose). La réponse obtenue est aussi significativement ( $P<0,0001$ ) plus importante pour les particules dispersées par rapport aux particules non dispersées (entre 800 et  $1200\text{pg.mL}^{-1}$ ). Les différentes poudres semblent montrer un effet moins important lorsque la dose augmente.

La poudre 7 entraîne une inflammation plus importante que les autres particules (entre  $1700$  et  $1900\text{pg.mL}^{-1}$ ).

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus précédemment (cf poudres industrielles avant et après traitement), où la diminution de la taille des agglomérats entraîne un état d'inflammation plus important.

Les résultats exprimés en fonction de la surface ne montrent pas d'effet de ce paramètre sur l'inflammation. Bien que les différentes particules aient des surfaces spécifiques différentes (Annexe C, Figure 168).

#### IV.2.2.3. Stress oxydant

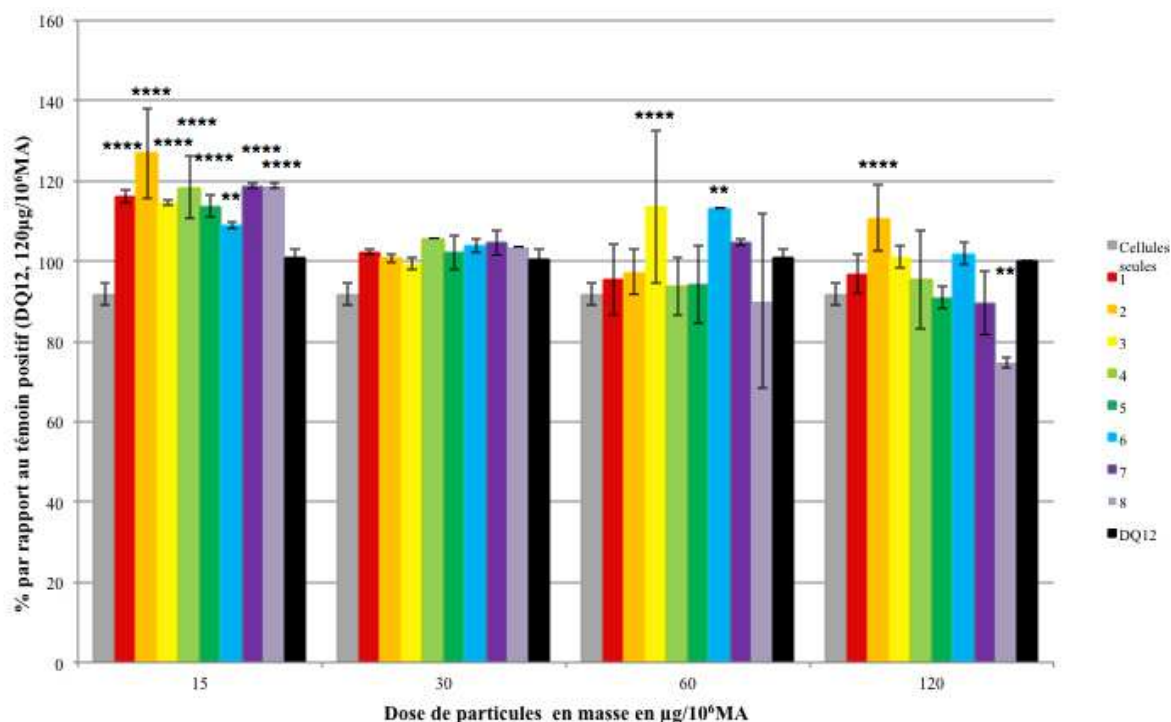


**Figure 131 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Nous retrouvons un profil équivalent de stress oxydant par rapport aux autres particules avec des résultats inférieurs aux cellules seules sur l'ensemble des particules de boehmite étudiées. En effet, le stress oxydant mesuré est de l'ordre de 0,3 nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et nettement en dessous des témoins positif et négatif de toxicité. Il est de plus inférieur aux résultats obtenus avant dispersion (P<0,01). Après 90minutes, les particules n'entraînent donc pas d'effet stress oxydant pour les cellules. Il semble donc y avoir un effet de la taille sur le stress oxydant, où

nous observons une diminution du stress oxydant lorsque la taille des agglomérats diminue. Cette observation rejoint les observations déjà faites dans ce sens pour les particules industrielles, avant et après broyage ou bien un problème majeur d'adsorption qui pourrait augmenter avec l'effet taille.

Les résultats représentés en fonction de la surface sont équivalents pour les différentes poudres et ne montrent donc pas d'effet de surface (Annexe C, Figure 169).



**Figure 132 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01,\*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))**

Le stress oxydant mesuré après 24h de contact apparaît modéré pour les différentes poudres étudiées après dispersion, de la même manière que pour les poudres avant dispersion. Les résultats sont proches du témoin positif de toxicité. Les poudres de boehmite étudiées n'induisent pas la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nous observons une relation dose-dépendante pour le DQ12 (ROS et TOX). Les résultats convertis en surface ne montrent encore une fois aucun effet de la surface sur le stress oxydant (Annexe C, Figure 170).

**IV.2.3. Evolution globale de l'activité biologique**

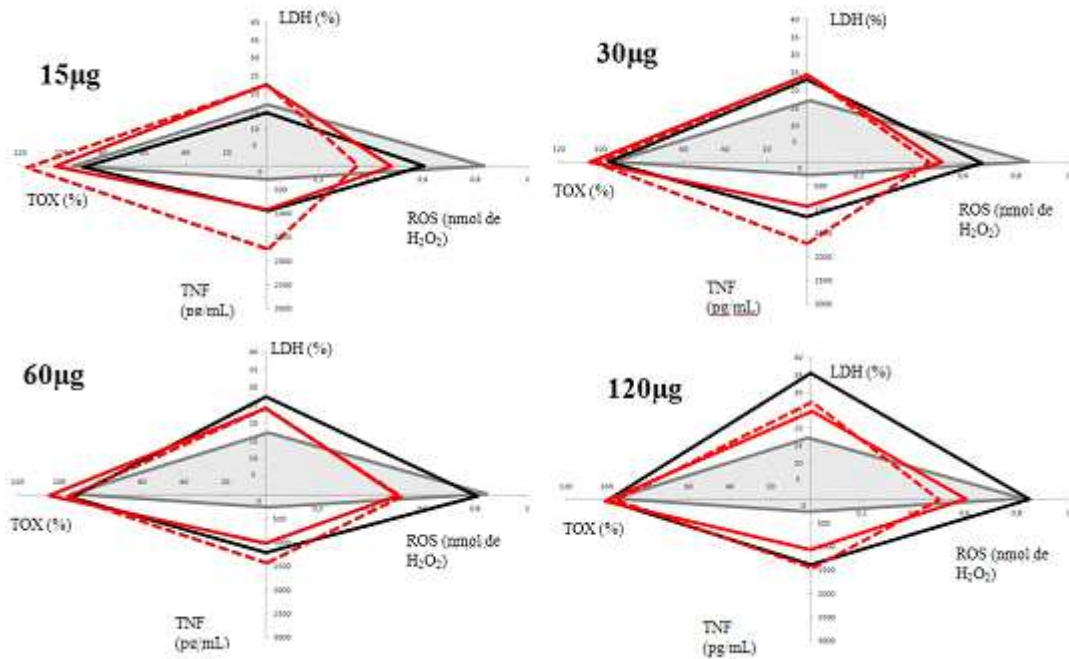


Figure 133 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 1 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)

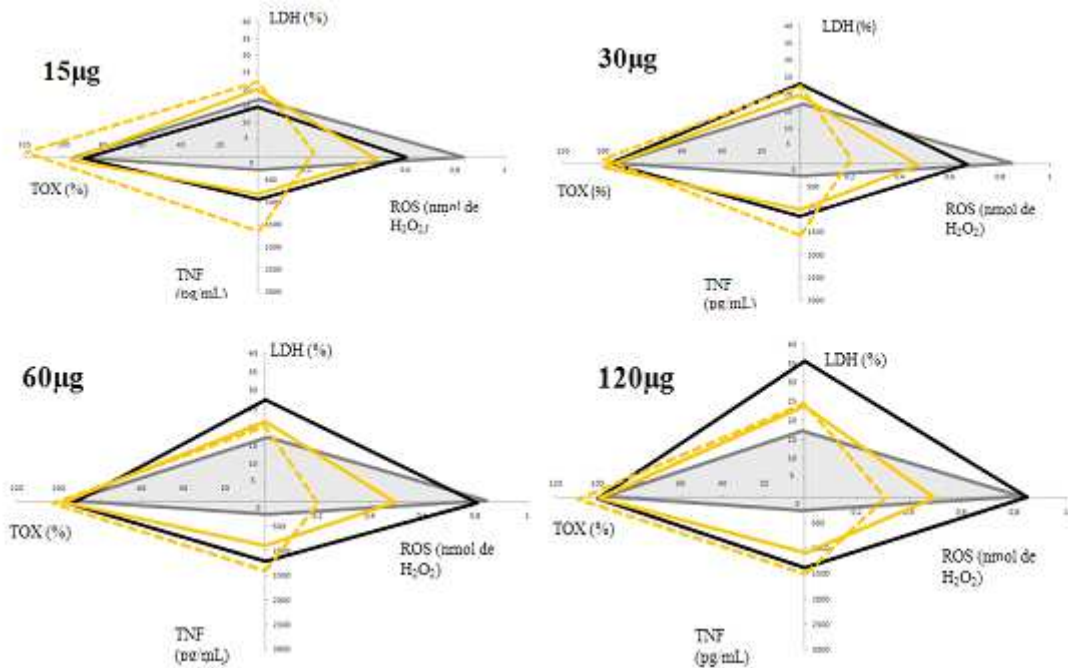


Figure 134 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 2 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)

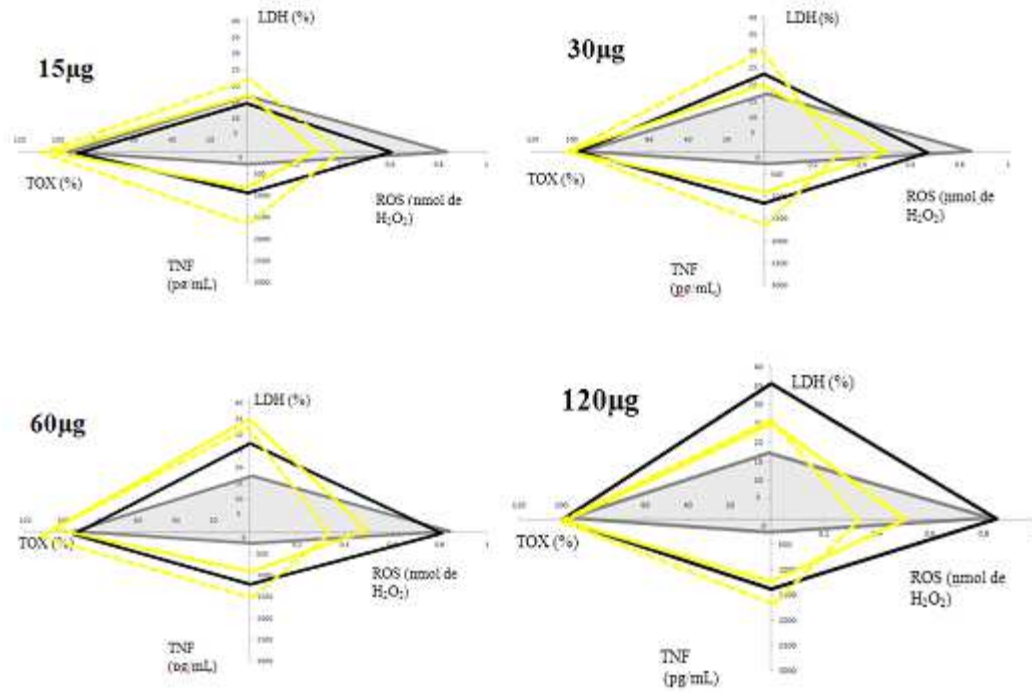


Figure 135 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 3 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)

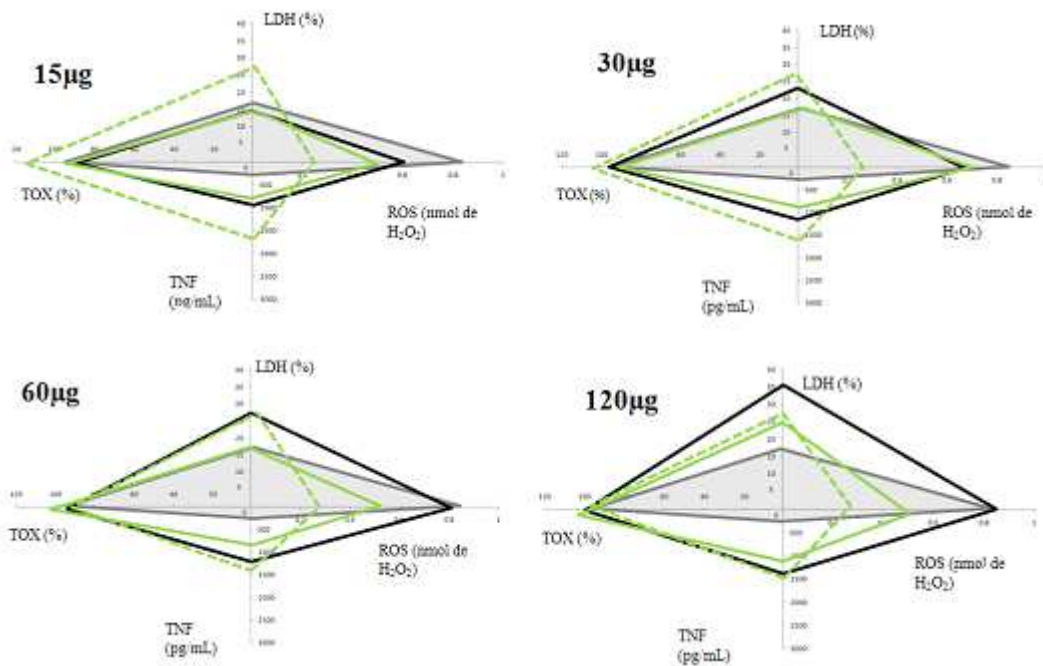


Figure 136 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 4 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)

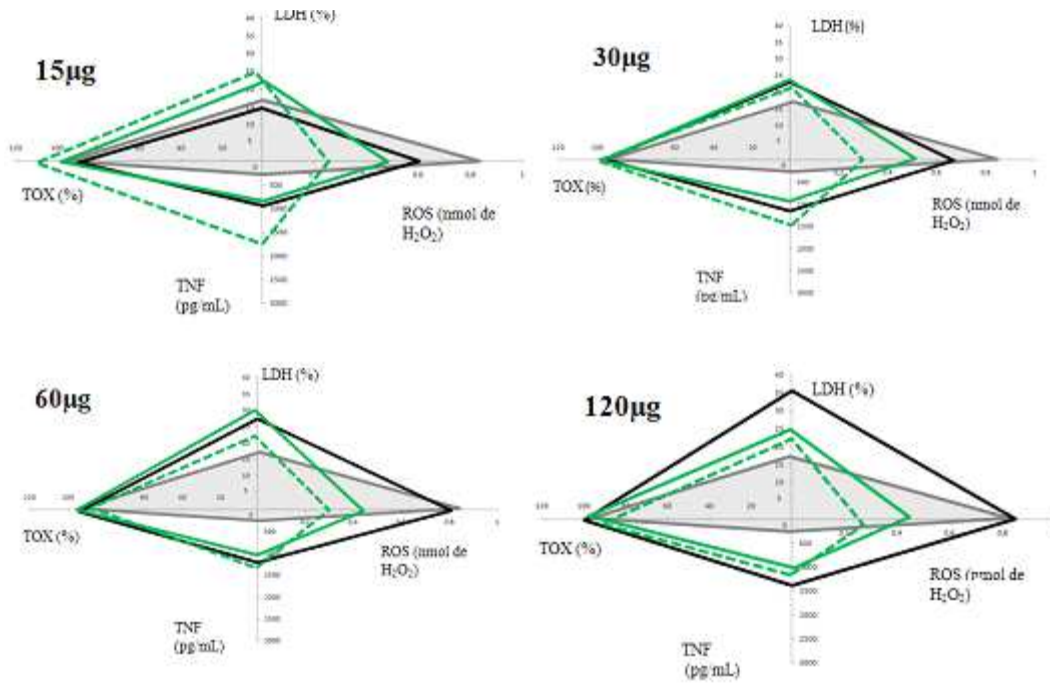


Figure 137 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 5 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)

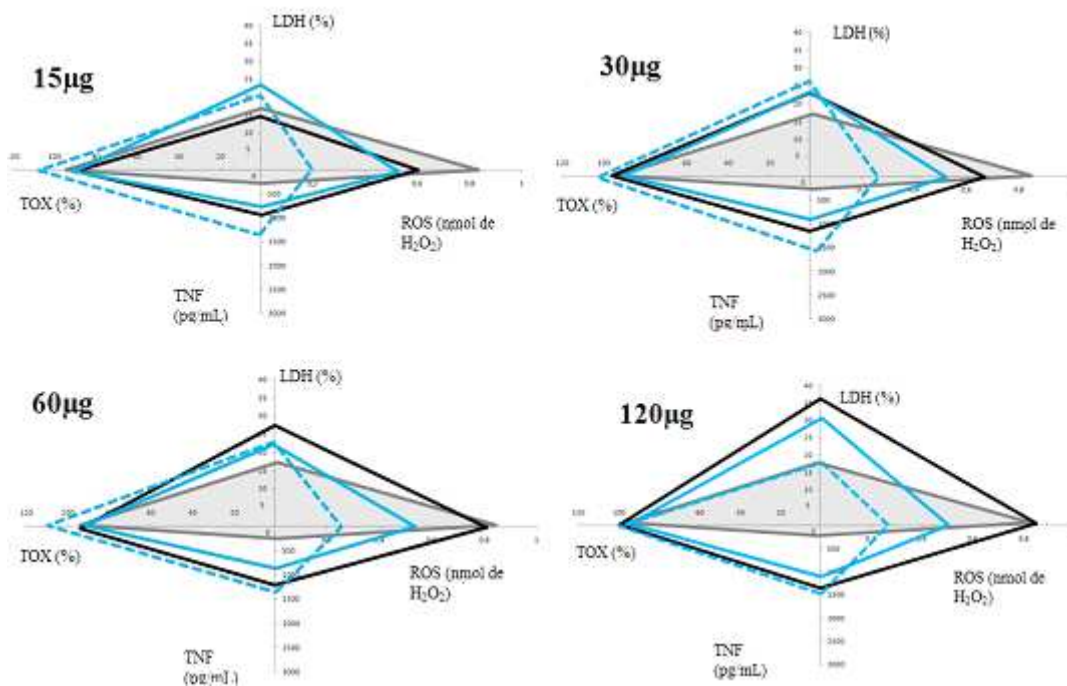
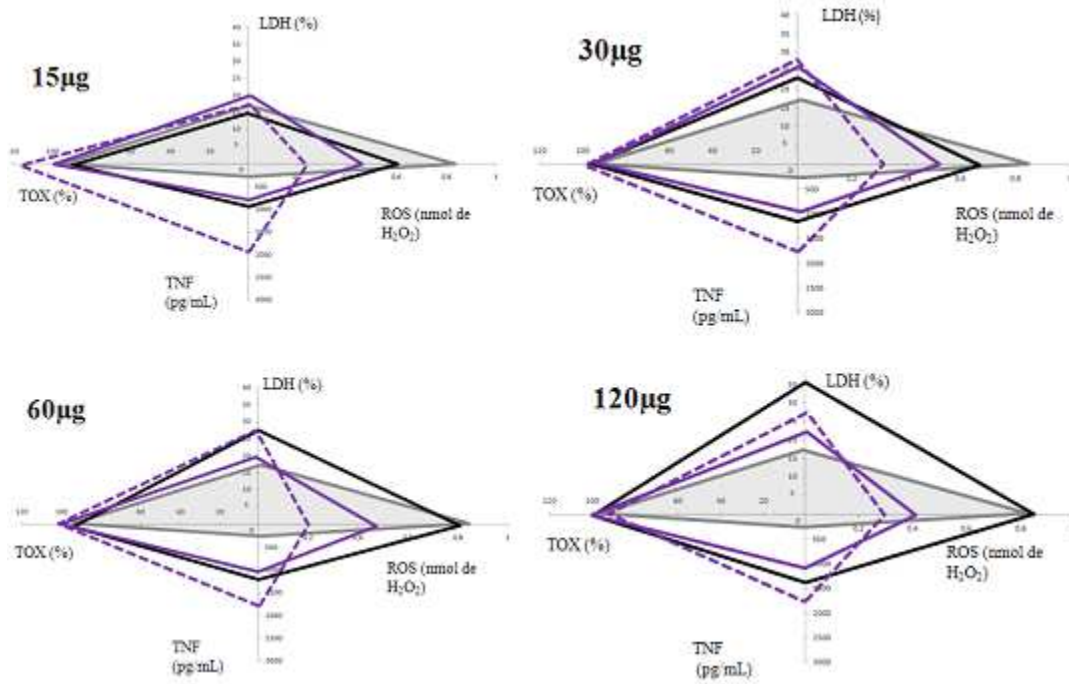
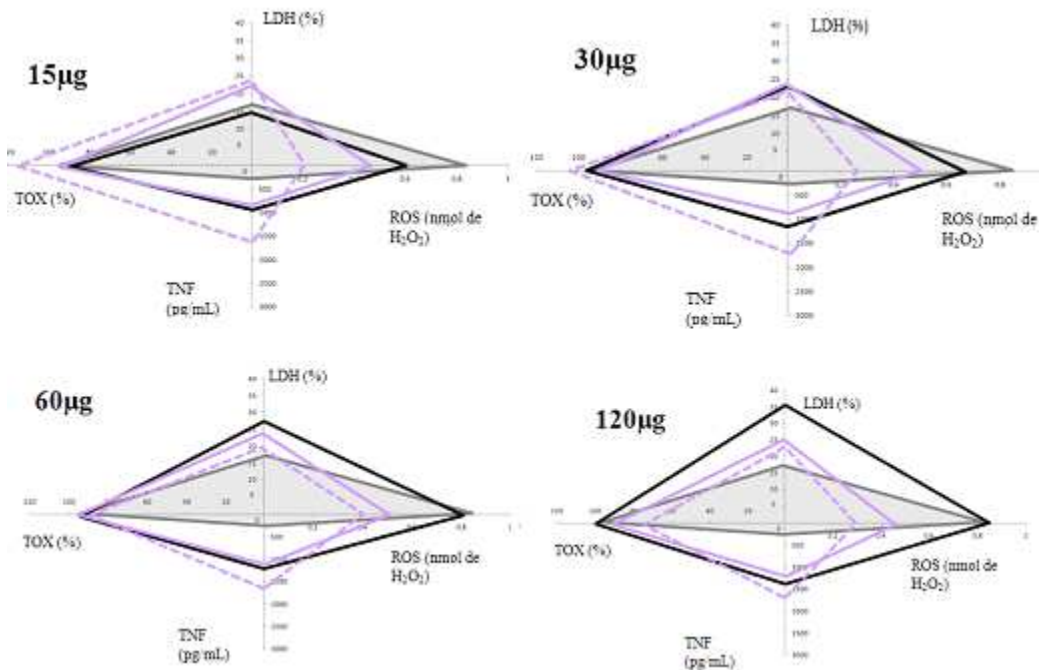


Figure 138 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 6 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)



**Figure 139 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 7 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**



**Figure 140 : Evolution de l'activité biologique globale de particules « 8 » avant dispersion et après (pointillé) par rapport au contrôle cellule sans particules (gris) et au témoin positif de toxicité (noir)**

Les particules avant et après dispersion montrent des différences notables notamment en ce qui concerne l'inflammation. En effet nous constatons qu'après dispersion l'effet inflammatoire augmente ainsi que la cytotoxicité et que pour les autres paramètres la



diminution de la taille des particules obtenues par dispersion à entraîner une diminution du stress oxydant si on se réfère aux valeurs brutes. Mais il faut peut être prendre aussi en considération un problème d'adsorption majeur conduisant à des faux négatifs.

#### **IV.2.4. Conclusion**

Le tableau suivant résume l'activité biologique des différentes particules de boehmite.

Échantillons	Paramètres					
	Avant dispersion			Après dispersion		
	Etat d'inflammation	Mort cellulaire	Stress oxydant	Etat d'inflammation	Mort cellulaire	Stress oxydant
	TNF- $\alpha$	LDH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	TNF- $\alpha$	LDH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)
<b>1</b>	+++	+	-	++++	++	-
<b>2</b>	+++	+	-	++++	++	-
<b>3</b>	+++	+	-	++++	++	-
<b>4</b>	+++	+	-	++++	+++	-
<b>5</b>	+++	+	-	++++	++	-
<b>6</b>	+++	+	-	++++	++	-
<b>7</b>	+++	+	-	++++	++	-
<b>8</b>	+++	+	-	++++	++	-

		TNF- $\alpha$	LDH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Nul	-	<250 pg.mL <sup>-1</sup>	<20%	ROS : <0,8 nmol TOX :<100%
Modéré	+	Entre 250 et 500 pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 20 et 22%	
Important	++	Entre 500 et 900 pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 22 et 25%	
Très important	+++	Entre 900 et 1400pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 25 et 35%	
Extrêmement important	++++	>1400pg.mL <sup>-1</sup>	>35%	

**Tableau 22: Résumé de l'activité biologique des particules industrielles de boehmite**

Pour résumer, les différentes particules obtenues par synthèse hydrothermale présentent des résultats comparables avec une activité biologique importante. Elles montrent un stress oxydant en apparence nul, une cytotoxicité importante ainsi qu'un effet inflammatoire très important. Cependant nous ne constatons pas de différence flagrante entre les différentes particules, il n'y a donc pas d'effet de la taille des cristallites sur les résultats obtenus. En perspective de cette étude il serait intéressant de produire une poudre avec des particules de plus grande taille pour pouvoir ainsi plus facilement observer l'effet taille. Dans un deuxième temps il serait intéressant de reproduire une de ces poudres en quantité importante, de façon à pouvoir grâce à l'impacteur en cascade séparer les différentes classes granulométriques et ensuite observer leurs effets propres sur l'activité biologique.

Cependant la dispersion de ces poudres a montré un effet intéressant sur l'activité biologique. En effet lorsque la taille des agglomérats est diminuée par la dispersion, nous observons une augmentation de l'effet inflammatoire et de la cytotoxicité.

### **IV.3. Conclusion générale**

L'évaluation de l'activité biologique des différentes particules a montré des différences importantes entre les particules industrielles et les particules obtenues par synthèse hydrothermale. En effet nous notons une cytotoxicité (15 à 20%) et un état d'inflammation ( $\text{TNF-}\alpha < 500 \text{pg.mL}^{-1}$ ) pour les particules industrielles hormis pour les particules de bulky ( $\text{TNF-}\alpha > 1400 \text{pg.mL}^{-1}$ ). Ces résultats sont bien moins importants qu'avec les particules obtenues par synthèse hydrothermale ( $800 < \text{TNF-}\alpha < 1200 \text{pg.mL}^{-1}$ , 15%  $< \% \text{LDH}_{\text{Relarguée}} < 23\%$ ). Cependant nous constatons l'absence de stress oxydant dans tous les cas. En ce qui concerne le témoin positif de toxicité le quartz DQ12, celui-ci se révèle être un bon témoin dans le cas de la cytotoxicité et de l'état d'inflammation mais n'induit pas de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces résultats sont en accord avec ceux de Bruch (Bruch 2004). Cependant en perspective il serait intéressant d'utiliser un témoin positif plus adapté pour le stress oxydant.

Il est cependant important de noter la mise en évidence de l'influence de la taille des agglomérats lors de notre étude. En effet nous avons observé que la dispersion par sonication, le broyage ou l'élutriation des agglomérats entraînent des modifications de l'activité biologique. Ces traitements se sont caractérisés par une augmentation de la cytotoxicité et de l'état inflammatoire des particules. Lors d'une approche *safe by design* il sera donc important de tenir compte de ces observations. Ces résultats sont en accord avec ceux de Pauluhn (Pauluhn 2009, Pauluhn 2011) qui à travers deux publications ont démontré que les agglomérats composés de particules nanométriques inhalées par des rats entraînent une toxicité pulmonaire selon la taille des agglomérats et non des particules primaires.

En ce qui concerne les particules de bulky, nous observons une réponse inflammatoire très élevée. Il serait donc intéressant de vérifier l'effet des endotoxines. Les endotoxines sont des bactéries préférentiellement associées à des particules grossières qui ont la particularité d'avoir un fort potentiel pro-inflammatoire (Osornio-Vargas AR 2003, Schins RP 2004). Il serait donc intéressant de mesurer la concentration en TNF- $\alpha$  pour les particules de bulky en présence d'une protéine de recombinaison neutralisant les endotoxines. Une étude de Ramgolam a en effet montré que cette protéine de recombinaison empêchait la libération de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) par des 16HBE (cellules épithéliales bronchiques) induite par des particules grossières après 24h de contact (Ramgolam 2009).

Il est aussi intéressant de souligner l'importance d'étudier différents domaines de l'activité biologique (cytotoxicité, stress oxydant, réponse inflammatoire, modification morphologique) au vu du nombre limité de publications à ce sujet. Il est cependant primordial de poursuivre le travail de recherche des principaux paramètres clefs de la réponse cellulaire afin d'établir un outil d'évaluation plus complet qui permettra une évaluation plus fiable de l'activité biologique globale des particules étudiées et notamment l'effet sur le stress oxydant en incluant la génotoxicité.

Les particules de boehmite sont incapables de rompre des liaisons et de générer des radicaux libres. Le stress oxydant constitue cependant un paramètre fondamental de l'étude de l'activité biologique des particules. En effet, par transposition au milieu biologique, ces radicaux peuvent être à l'origine de dommages cellulaires irréversibles par réaction avec les composants cellulaires tels que les lipides (Lin et al. 2006; Lundborg et al. 2007), les protéines (Ivana Fenoglio et al. 2003; Governa et al. 2005), l'ADN (I. Rahman 2002; Q. Rahman et al. 2002) etc... L'ensemble de ces effets contribue à l'entretien de la réponse cellulaire, à des modifications morphologiques des cellules et à la destruction des tissus.

Toutefois un phénomène important a été observé au cours de ces différents essais. Dans de nombreux cas de contacts cellules-particules nous avons constaté une réponse équivalente ou inférieure aux cellules témoins seules, suggérant que ces résultats peuvent aussi être représentatifs de faux négatifs, comme ce qui avait été observé par Val et al. Il devient donc extrêmement important de prendre également en compte l'adsorption des différentes biomolécules d'intérêt sur les nanoparticules au cours des tests réalisés, ceci afin d'établir une équation corrective prenant en compte cette potentielle adsorption.

En perspective, l'étude de l'interaction entre les particules et les cellules pourra apporter des informations permettant de mieux comprendre les mécanismes de réponse cellulaire (cinétique et quantification des particules phagocytées). En parallèle l'étude de l'interaction

entre les particules et le milieu permettra la détermination d'autres informations importantes (adsorption des protéines, désagglomération...).

Enfin l'évaluation de la génotoxicité apparaît indispensable et de nouveaux tests peuvent être envisagés en complément avec l'étude de l'apoptose.

Le but de ces perspectives sera de compléter les compétences existantes au niveau de notre plateforme d'évaluation de la toxicité biologique des particules, et de renforcer également les analyses entre les caractéristiques physico-chimiques et la toxicité biologique des particules.



# Chapitre V. INTERACTIONS PROTÉINES - NANOPARTICULES





# SOMMAIRE

Chapitre V. Interactions protéines - nanoparticules	245
<b>V.1. Introduction</b>	<b>249</b>
<b>V.2. Etude du phénomène artéfactuel</b>	<b>249</b>
V.2.1. Dégradation du TNF- $\alpha$	250
V.2.2. Adsorption sur la paroi des puits	251
V.2.3. Adsorption sur les nanoparticules	252
<b>V.3. Cinétique d'adsorption</b>	<b>254</b>
<b>V.4. Loi de correction</b>	<b>255</b>
<b>V.5. Conclusion</b>	<b>257</b>



## V.1. Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude des phénomènes d'adsorption qui peuvent se produire lors des tests d'évaluation de la toxicité biologique de nanoparticules. Des biomolécules présentes dans le milieu de culture ou produites par les cellules elles-mêmes sont susceptibles de s'adsorber sur les nanoparticules évaluées. C'est le cas d'une molécule cible, le TNF- $\alpha$  dont la production est souvent évaluée dans la plupart des études de toxicité biologique. Notre objectif a été de mesurer tout d'abord la dégradation de cette molécule au cours des 24h de temps de contact, puis son adsorption, ceci afin d'établir une loi de correction permettant de limiter les artefacts de mesure potentiels à l'origine de résultats erronés, sous la forme notamment de faux négatifs.

En effet suite aux résultats obtenus lors de nos tests biologiques, nous nous sommes aperçus de possibles interactions nanoparticules/protéines entraînant des faux négatifs pour les tests de cytotoxicité, notamment concernant le relargage de la LDH. En effet le relargage pour les particules de boehmite ( $11\% < \%LDH_{\text{Relarguée}} < 20\%$ ) est en dessous du témoin négatif de toxicité ( $\%LDH_{\text{Relarguée}} \approx 18\%$ ), en particulier pour les particules de dispersal ( $11\% < \%LDH_{\text{Relarguée}} < 15\%$ ) qui sont donc utilisées au cours de cette étude. Cependant ne possédant aucune information concernant la LDH fournie avec notre kit de dosage, nous avons été dans l'impossibilité de commander la même référence afin de réaliser des tests d'adsorption en conditions acellulaires avec ou sans particules. Nous avons donc choisi de réaliser cette étude d'adsorption avec une autre biomolécule d'intérêt : TNF- $\alpha$  pour lequel nous pouvons utiliser les flacons en excès du kit ELISA servant à la réalisation de la gamme étalon lors de la technique ELISA. Le TNF- $\alpha$  ne remplace en rien la LDH mais nous a permis d'établir notre méthodologie d'évaluation de l'adsorption, et d'avoir des premiers résultats confirmant l'importance de ce phénomène à la surface des particules. D'après la littérature d'autres études ont en effet montré la légitimité de ces interactions nanoparticules/molécules biologiques interférant avec les tests usuels de toxicité (Cedervall et al. 2007; Val 2009; Akhtar et al. 2010), mais à ce jour leur prise en compte dans les évaluations biologiques n'est pas encore formalisée. Nous avons donc essayé de mettre au point une loi de correction qui permettrait de prendre en compte ce phénomène au niveau des résultats obtenus.

## V.2. Etude du phénomène artefactuel

Lors des tests de toxicité, deux phénomènes simultanés peuvent se produire et conduire à une sous-estimation des résultats donc à des faux négatifs: la dégradation et l'adsorption du TNF- $\alpha$  sur les nanoparticules et les puits de culture. Notre objectif a été de quantifier à la fois le TNF- $\alpha$  dégradé et adsorbé en prenant en compte les paramètres de support, de temps et de

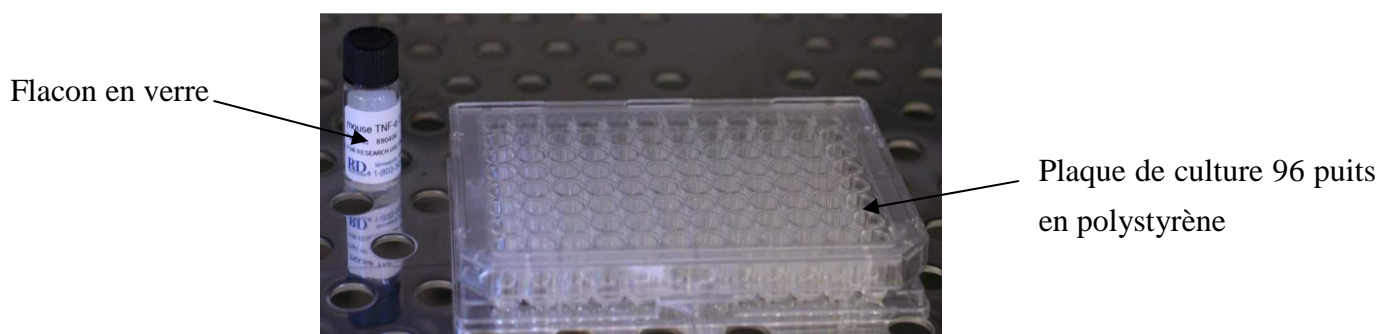
température d'incubation qui n'ont jamais été évalués jusque là dans la littérature, d'où l'originalité de cette étude.

Pour cela, une solution de TNF- $\alpha$  de composition et concentration connues a été utilisée, elle est fournie avec le kit ELISA que nous employons pour nos tests de toxicité (Quantikine® Mouse TNF- $\alpha$  Immunoassay, R&D Systems). Les essais ont été réalisés en milieu acellulaire.

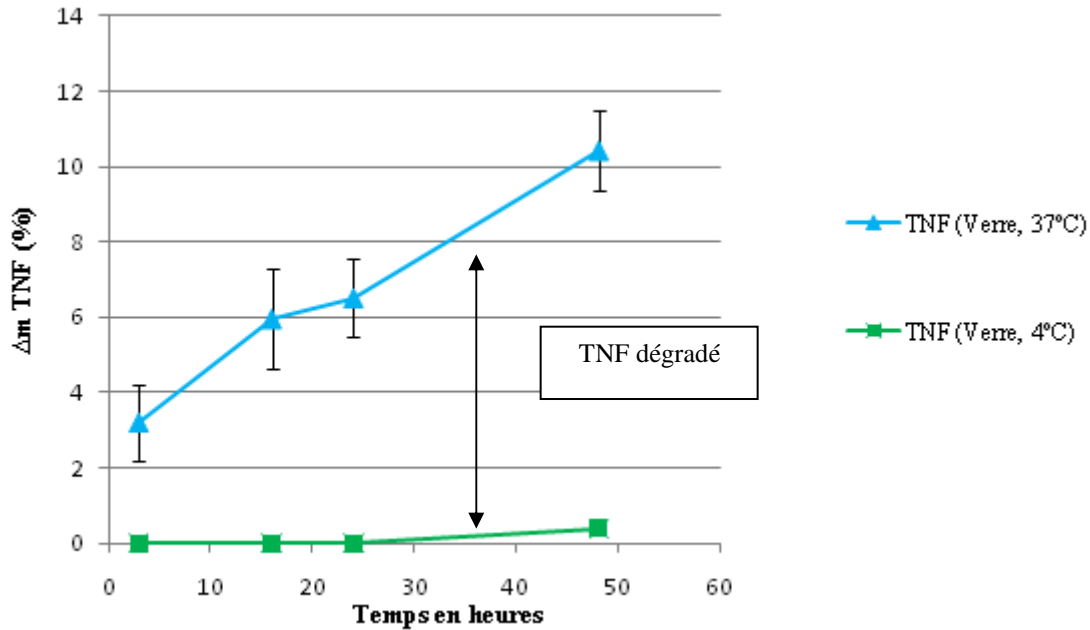
### **V.2.1. Dégradation du TNF- $\alpha$**

Dans un premier temps, nous avons étudié la dégradation du TNF- $\alpha$  en fonction du temps et de la température. Nous avons limité l'adsorption du TNF- $\alpha$  sur les parois du support en travaillant avec des flacons en verre afin de pouvoir déterminer le plus précisément possible la quantité de TNF- $\alpha$  dégradé. Les rapports Volume/Surface ( $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) sont de 190 dans le verre et 66 dans les puits usuels en polystyrène des boîtes de culture. Il y a donc une différence de rapport 3 entre les deux types de supports. Ayant un rapport V/S plus petit, l'adsorption devrait être plus importante dans le support en polystyrène, l'utilisation du support en verre permet donc de limiter la quantité de TNF- $\alpha$  potentiellement adsorbée.

D'un point de vue expérimental, une quantité définie de TNF- $\alpha$  a été incubée dans le milieu de culture complet que nous utilisons pour les cellules RAW 264.7, le DMEMc (1500 pg/mL correspondant à 75 pg de TNF- $\alpha$  en masse sèche) dans un flacon en verre à différentes températures : 4°C (réfrigérateur) ce qui correspond à la température des conditions de stockage pour les réactifs afin de limiter le phénomène de dégradation ou 37°C (étuve), ce qui correspond aux conditions d'expériences *in vitro*. Les essais ont ensuite été réalisés pendant différentes durées (3h, 16h, 24h et 48h) dans le but de déterminer si le TNF- $\alpha$  dilué dans le milieu de culture a été dégradé au cours du temps et en fonction de la température.



**Figure 141 : Photo d'un flacon en verre et d'une plaque de culture 96 puits**



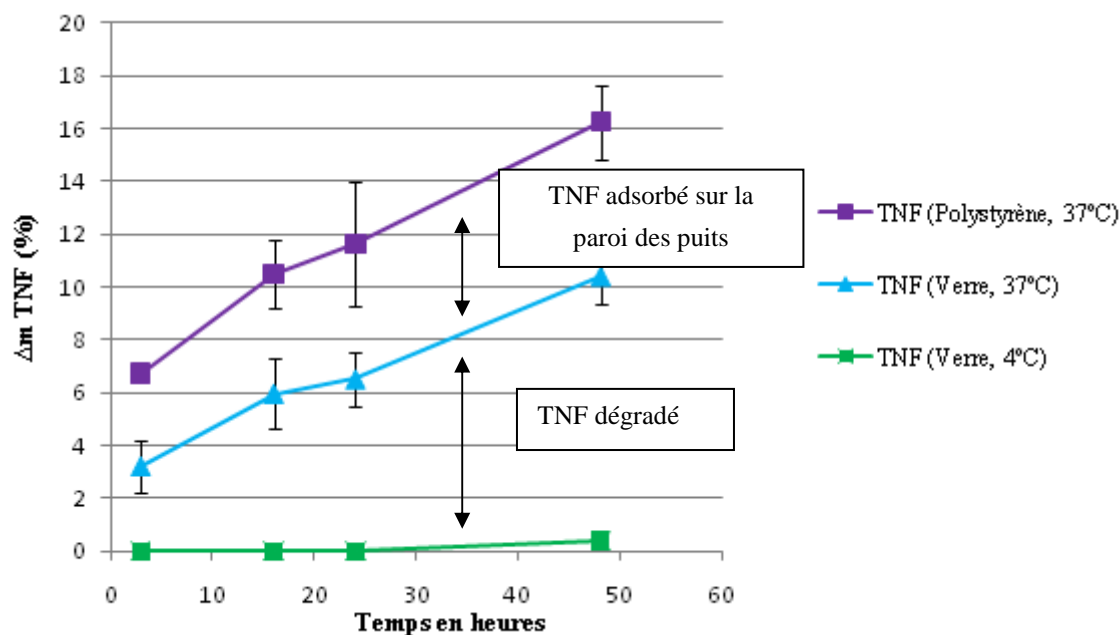
**Figure 142 : Dégradation du TNF- $\alpha$  en fonction de la température (37°C et 4°C), en milieu acellulaire et sur un support en verre afin de limiter l'adsorption sur les parois.**

Le  $\Delta m$  de TNF- $\alpha$  représente la différence entre la quantité de TNF- $\alpha$  introduite et la quantité de TNF- $\alpha$  mesurée, multipliée par 100 et divisée par la quantité de TNF- $\alpha$  introduite.

Les résultats montrent que le TNF- $\alpha$  se dégrade à vitesse constante à 37°C, tandis qu'il n'y a aucune dégradation significative à 4°C. En effet à 4°C nous observons une perte de masse nulle après 1h de contact alors qu'à 37°C nous observons une perte de masse de TNF- $\alpha$  d'environ 3% après 1h de contact. Après 24h, la perte de masse à 4°C est toujours nulle alors que la perte de masse pour l'échantillon placé à 37°C est de 6,5%. Cette perte de masse est alors associée à la dégradation du TNF- $\alpha$ . De plus, les résultats montrent que la vitesse de dégradation du TNF- $\alpha$  est constante en fonction du temps, il est alors possible de la déterminer à 0,12pg/heure à 37°C. Il est donc dans un premier temps possible de prendre en compte ce phénomène de dégradation certes limité mais bien réel lors des études *in vitro* à 37°C, pour l'obtention des valeurs définitives de dosages du TNF- $\alpha$ .

### **V.2.2. Adsorption sur la paroi des puits**

Dans le but d'évaluer l'adsorption du TNF- $\alpha$  sur les parois des puits, nous avons utilisé une plaque de culture 96 puits en polystyrène. La même quantité de TNF- $\alpha$  (1500pg/mL) a été ajoutée au DMEMc et placée à 37°C pendant différentes durées (3h, 16h, 24h et 48h).



**Figure 143 :** Evolution du  $\Delta m$  de TNF- $\alpha$  au cours du temps en milieu acellulaire en fonction de la température (4°C et 37°C), et de la nature du support verre ou polystyrène.

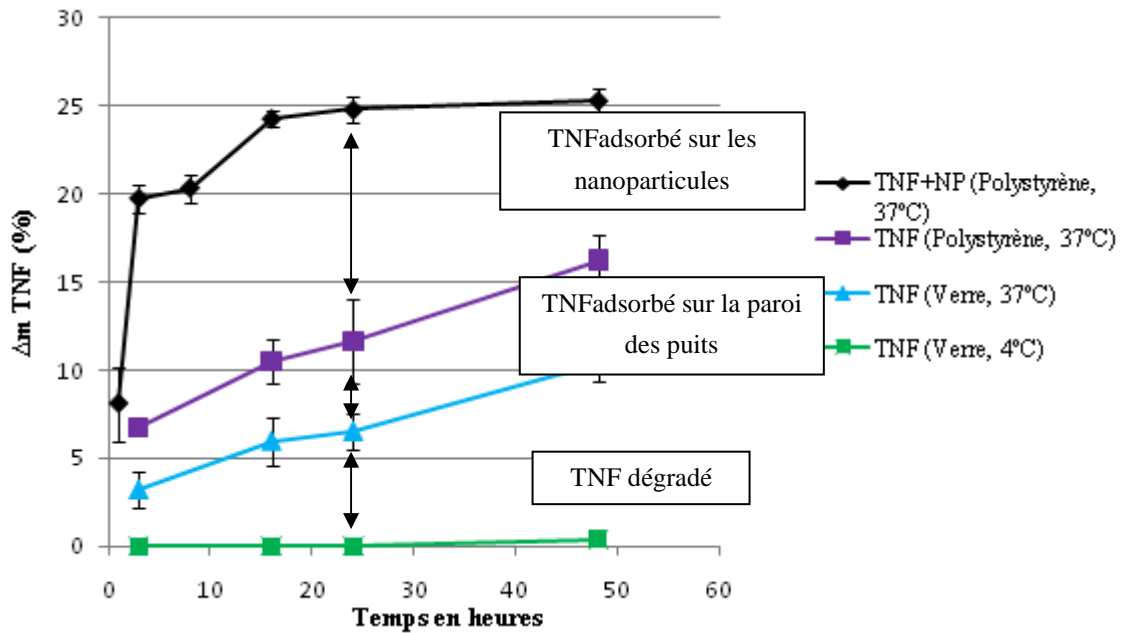
Des différences ont été observées en fonction de la nature du support (verre ou polystyrène, Figure 143) et de la température d'incubation (4°C ou 37°C). Après 24h d'incubation à 37°C, 12 % de perte de masse ont été observées lors des essais réalisés dans le support en polystyrène (dégradation et adsorption du TNF- $\alpha$ ) alors que seulement 6,5 % de perte de masse dans le support en verre (majoritairement le phénomène de dégradation). Nous démontrons ainsi une adsorption significative sur les parois des puits (5,5%) dans lesquels nous réalisons nos essais qui a été calculée par la différence entre les expériences dans les puits de culture en polystyrène et dans le flacon en verre.

Celle-ci étant non négligeable il est important de la prendre en considération dans l'expression finale des résultats afin d'obtenir des valeurs de dosages les plus justes possibles, voire d'éviter de faux négatifs.

### **V.2.3. Adsorption sur les nanoparticules**

Pour étudier l'adsorption du TNF- $\alpha$  sur les nanoparticules, nous avons ajouté une quantité connue de nos nanoparticules d'intérêt c'est-à-dire la boehmite (disperal), au contact du TNF- $\alpha$  (120 $\mu$ g soit 12 $\mu$ g de nanoparticules par puits de culture) dans le DMEMc pendant 24h dans une plaque de culture 96 puits représentatif de nos conditions expérimentales usuelles de contact cellules/particules. Après incubation avec les nanoparticules, le milieu est prélevé et la concentration en TNF- $\alpha$  est évaluée. La variation de masse du TNF- $\alpha$  est déterminée par la

différence entre les résultats obtenus avec et sans nanoparticules compte tenu que les deux expériences sont réalisées dans les mêmes conditions et avec le même kit de dosage ELISA.



**Figure 144 : Evolution du  $\Delta m$  de TNF- $\alpha$  au cours du temps en fonction de la température (4°C or 37°C), de la nature du support (verre ou polystyrène) et de la présence ou non de nanoparticules de boehmite en milieu acellulaire**

Pour les essais réalisés dans les puits de culture, après 1h aucune différence significative de perte de masse de TNF- $\alpha$  n'a été observée entre les essais réalisés avec et sans nanoparticules (environ 7wt% pour les deux conditions) (Figure 144). Par contre, après 2h nous avons observé une différence significative dans la valeur de  $\Delta m$  de TNF- $\alpha$  entre les conditions avec (19%) et sans nanoparticules (8%). Ceci est donc compatible avec un processus d'adsorption sur les nanoparticules. Une perte de masse d'environ 24,8 % après 24 h d'incubation est en effet observée, alors que pour les essais sans nanoparticules la perte de masse est comparativement de 12 %. Ces résultats montrent qu'une adsorption significative se produit sur les nanoparticules (environ 13%). Pour des durées plus longues d'incubation nous observons un plateau après 48h la perte de masse se situe aux alentours de 25,2wt%. L'adsorption du TNF- $\alpha$  sur les nanoparticules de boehmite atteint donc un maximum après 24h d'incubation à 37°C c'est-à-dire au temps choisi pour nos conditions expérimentales. Il est donc indispensable de prendre en considération ce phénomène dans nos analyses biologiques.

La concentration de TNF- $\alpha$  mesurée dans le surnageant correspond donc au TNF- $\alpha$  généré par les cellules auquel nous devons soustraire le TNF- $\alpha$  adsorbé par les puits et les

nanoparticules ainsi que le TNF- $\alpha$  dégradé au cours du temps. Ceci amène à l'équation suivante:

$$[\text{TNF-}\alpha]_{\text{dans le surnageant}} = [\text{TNF-}\alpha]_{\text{produit}} - [\text{TNF-}\alpha]_{\text{adsorbé sur (NP+puits)}} - [\text{TNF-}\alpha]_{\text{dégradé}}$$

### Équation V-1

Le but de la dernière partie est donc d'établir une loi de correction afin de prendre en compte ces phénomènes de dégradation et d'adsorption, lors des tests d'évaluation biologique.

### V.3. Cinétique d'adsorption

Dans le but d'établir cette loi de correction, nous avons étudié la cinétique d'adsorption du TNF- $\alpha$  sur les nanoparticules de boehmite (disperal). Pour cela nous avons réalisé différents ratios en faisant varier la masse de TNF- $\alpha$  (entre 75pg et 9pg) et en gardant la masse de boehmite constante (12 $\mu$ g). Nous obtenons alors différents ratios (masse de TNF- $\alpha$ /masse de boehmite) en pg/ $\mu$ g (0,78 ; 1,56 ; 3,13 ; 6,25). Les contacts des nanoparticules et les différentes suspensions de TNF- $\alpha$  ont été réalisés pour des durées d'incubation différentes de 1, 3, 16 et 24 heures à 37°C, dans nos conditions d'évaluation biologique standard. Pour les différentes conditions, le TNF- $\alpha$  résiduel a été mesuré en utilisant le test ELISA comme décrit précédemment. La masse adsorbée de TNF- $\alpha$  a ensuite été représentée en fonction du temps d'incubation pour les différents ratios (Figure 145). La quantité de TNF- $\alpha$  adsorbée a été calculée comme la différence entre la concentration résiduelle et la concentration initialement introduite de TNF- $\alpha$  dans le surnageant, tout en prenant soin de soustraire le TNF- $\alpha$  dégradé connaissant la vitesse de dégradation préalablement évaluée.

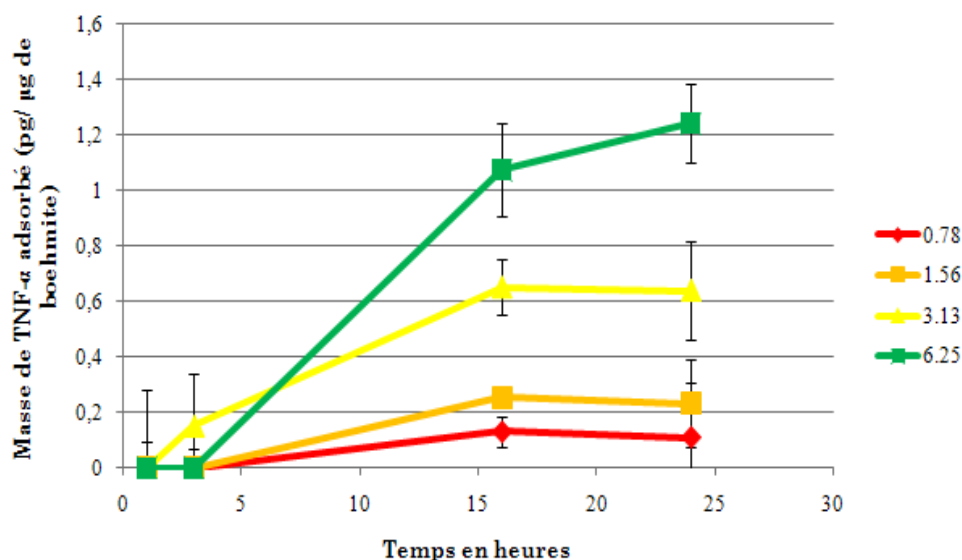


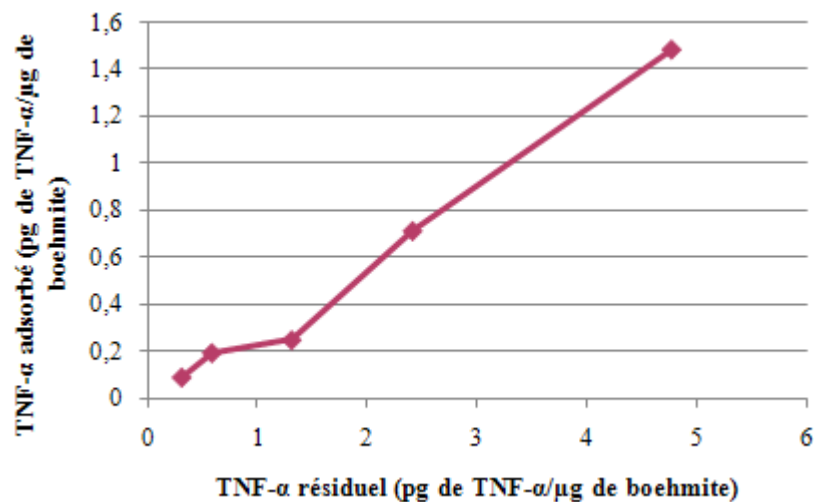
Figure 145 : Cinétique d'adsorption pour différents ratios, masse de TNF- $\alpha$  par rapport à la masse de boehmite (0,78 - 1,56- 3,13- 6,25)



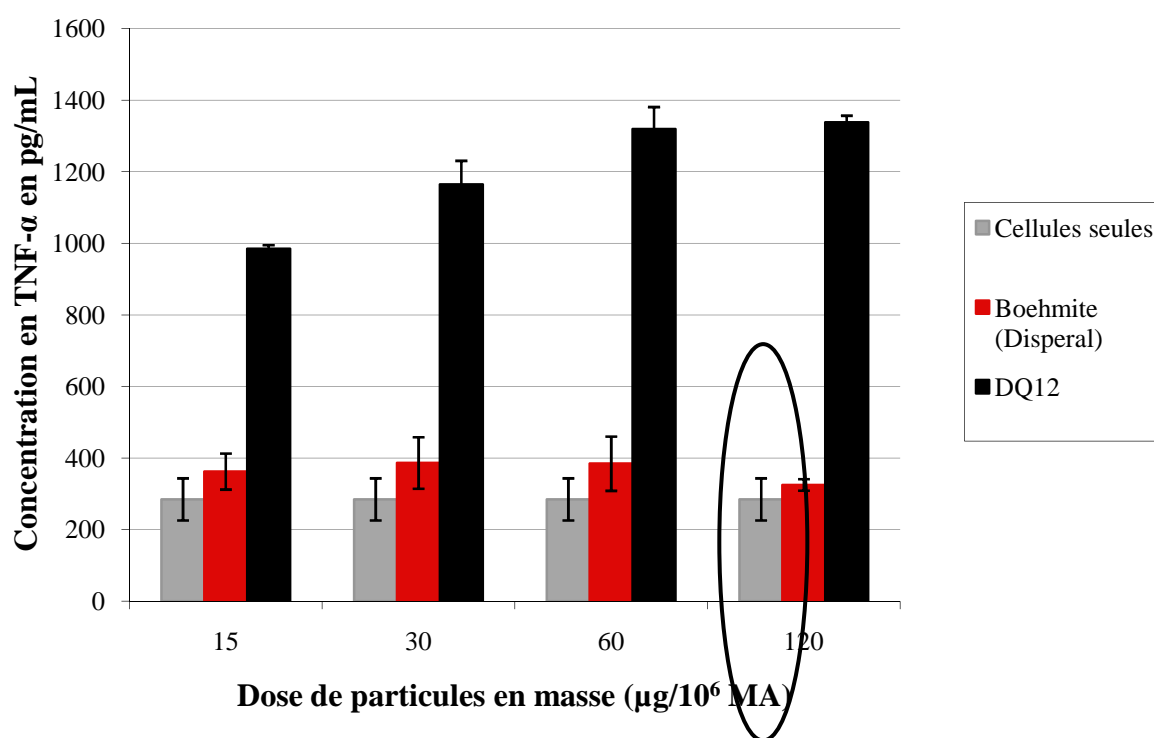
Après 24h, la quantité de TNF- $\alpha$  adsorbée par les nanoparticules de boehmite atteint un état pseudo stationnaire quel que soit le ratio masse de TNF- $\alpha$  / masse de boehmite utilisée (Figure 145). De plus 24h correspond au temps d'incubation réalisé lors des différents tests biologiques. Il est alors possible de tracer la courbe décrivant la masse de TNF- $\alpha$  adsorbée en fonction de la masse de TNF- $\alpha$  résiduelle. Ce graphique représente alors l'isotherme d'adsorption, il va permettre de corriger les résultats prenant en compte la quantité de TNF- $\alpha$  dégradé et adsorbé sur les parois des puits de cultures et sur les nanoparticules.

#### V.4. Loi de correction

Afin de déterminer cette loi de correction nous avons tracé la courbe représentant le TNF- $\alpha$  adsorbé (calculé comme la différence entre le TNF- $\alpha$  introduit et le TNF- $\alpha$  résiduel c'est à dire mesuré) en fonction du TNF- $\alpha$  résiduel après 24h pour les différents ratios, en prenant bien soin de soustraire au préalable le TNF- $\alpha$  dégradé. Cette courbe permet alors de déterminer la quantité de TNF- $\alpha$  adsorbée en connaissant la quantité de TNF- $\alpha$  résiduelle après la réalisation d'un dosage.



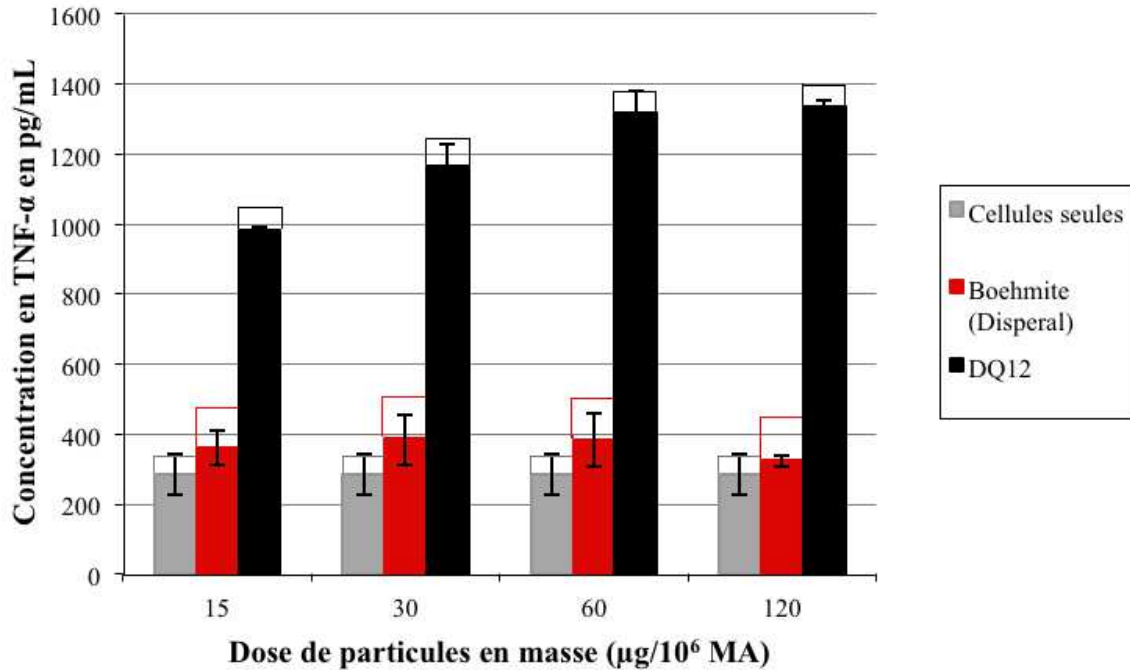
*Figure 146 : Courbe de correction représentant le TNF-  $\alpha$  adsorbé en fonction du TNF-  $\alpha$  résiduel mesuré après 24h d'incubation*



**Figure 147 : Concentration en TNF- $\alpha$  en fonction d'une dose de boehmite en masse**

Par exemple pour une dose de  $120\mu\text{g}/10^6\text{MA}$  (boehmite type disperal), la concentration de TNF- $\alpha$  après 24h est d'environ  $300 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ce qui représente  $1,25\text{pg}$  de TNF- $\alpha$  par  $\mu\text{g}$  de boehmite. Grâce à la courbe de correction il est possible de remonter à la quantité de TNF- $\alpha$  adsorbée par  $\mu\text{g}$  de boehmite. En effet selon la courbe de correction établie (Figure 146) pour  $1,25 \text{ pg}$  de TNF- $\alpha$  / $\mu\text{g}$  de boehmite résiduelle il y aurait proportionnellement  $0,2 \text{ pg}$  de TNF- $\alpha$  / $\mu\text{g}$  de boehmite adsorbée.

Néanmoins la masse de boehmite introduite lors du test est de  $12\mu\text{g}$  soit  $2,4 \text{ pg}$  de TNF- $\alpha$  adsorbé. Il ne faut pas oublier d'ajouter la partie dégradée que nous avons précédemment évaluée à  $0,12 \text{ pg}$  par heure soit après 24h,  $2,88\text{pg}$  de TNF- $\alpha$  dégradée. En définitif pour une dose introduite de  $120\mu\text{g}/10^6\text{MA}$  en masse, nous avons 25% d'artéfacts prenant en compte l'adsorption (5,5% sur le support et 13% sur les nanoparticules) et la dégradation (6,5%), confirmant l'importance de déterminer ces artéfacts. Ces artéfacts (adsorption et dégradation) doivent ainsi être déterminés pour tous les tests biologiques réalisés.



**Figure 148 :** Concentration en TNF- $\alpha$  en fonction d'une dose de boehmite en masse après correction

En appliquant à nos résultats bruts de dosages du TNF- $\alpha$ , la loi de correction ainsi établie, nous obtenons les valeurs corrigées de production de TNF- $\alpha$  présentées à la Figure 148.

La différence entre les valeurs avant et après corrections ne sont cependant pas significativement différentes (test Anova) pour la disperal ainsi que pour toutes les autres particules auxquelles nous avons apporté la correction due au TNF- $\alpha$  dégradé (Figure 171 et Figure 172).

Il est important de préciser que cette loi de correction n'est valable que pour la poudre de boehmite (disperal) et le TNF- $\alpha$ . Pour réaliser des corrections pour d'autres nanoparticules ou d'autres cytokines il est indispensable de réaliser à nouveau une étude cinétique et de tracer une loi de correction adaptée aux conditions expérimentales : c'est à dire selon la nature des particules étudiées et la biomolécule d'intérêt. Il est aussi important de prendre en compte que le calcul est approximatif car la quantité de TNF- $\alpha$  dégradé est calculée pour une durée de 24h alors que dans les conditions expérimentales de contacts cellules/particules, le TNF- $\alpha$  n'est pas produit et relargué dès le début de l'expérience (contrairement aux conditions acellulaires).

## V.5. Conclusion

Les interactions protéines / nanoparticules constituent un phénomène dépendant des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules (taille, charge, potentiel zêta...) et de la

nature des protéines. Différents auteurs ont observé l'adsorption du TNF- $\alpha$  sur les nanoparticules de noir de carbone et de dioxyde de titane, mais aussi l'adsorption d'autres cytokines tels que l'interleukine (IL-6) et du granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) (Val 2009). D'autres auteurs ont montré des modèles décrivant la cinétique de l'adsorption des protéines sur les nanoparticules (Dell'Orco et al 2010; X. Xia et al 2010).

Néanmoins, l'objectif principal de notre travail a été d'apporter un nouvel éclairage sur les artefacts possibles lors des expériences *in vitro*.

Cette étude a donc été réalisée dans le but de caractériser les artefacts de dégradation et d'adsorption du TNF- $\alpha$  lors des tests de toxicité, puis de proposer une loi de correction afin d'aboutir à la valeur la plus réelle possible de la réponse pro-inflammatoire induite par le contact avec les nanoparticules de boehmite. Nous avons étudié la capacité d'un certain type de particules de boehmite (poudre dispersal) à adsorber le TNF- $\alpha$  représentatif de cette réponse inflammatoire. Les résultats ont montré à la fois une dégradation du TNF- $\alpha$  au cours du temps dépendante de la température, ainsi qu'une adsorption sur la paroi des puits de culture à la température de culture à 37°. Ces phénomènes peuvent entraîner dans nos conditions expérimentales une sous-estimation de la valeur de TNF- $\alpha$  réellement libérée lors des tests *in vitro*.

Pour ce faire, notre étude a consisté à mesurer l'adsorption d'une quantité introduite connue de TNF- $\alpha$  (1500 pg.mL<sup>-1</sup>), en condition acellulaire avec ou sans nanoparticules pour quantifier la quantité de TNF- $\alpha$  adsorbée (quantité adsorbée spécifiquement sur les nanoparticules introduites) et/ou dégradée

Nous avons démontré une adsorption significative de TNF- $\alpha$  sur les nanoparticules de boehmite dispersal. En effet, nous avons introduit dans notre système 75 pg de TNF- $\alpha$  et 12  $\mu$ g de boehmite au milieu de culture sans cellules. Après 24h d'incubation à 37°C, la perte de masse sèche représente 25% d'artefacts (5,5% de TNF- $\alpha$  dégradé, 6,5% de TNF- $\alpha$  adsorbé sur la paroi des puits et 13% de TNF- $\alpha$  adsorbé sur les nanoparticules). Ces résultats sont totalement dépendants à la fois des protéines ou cytokines et de la nature des particules en particulier de leurs propriétés physico-chimiques, notamment de leur surface spécifique et composition chimique.

En effet Val a montré par exemple que l'IL-6 n'a pas été absorbée sur les nanoparticules de noir de carbone et de dioxyde de titane, en revanche le GM-CSF et le TNF- $\alpha$  ont été complètement absorbés par les nanoparticules de noir de carbone et en partie par les nanoparticules de dioxyde de titane (60% pour GM-CSF et 25% pour le TNF- $\alpha$ ).

Ce travail a donc permis de confirmer les conclusions auxquelles ont abouti quelques équipes (Val et autres....), quant à l'adsorption plus ou moins importante de molécules

biologiques sur les nanoparticules. L'originalité de notre étude, c'est qu'elle souligne pour la première fois la nécessité de prendre aussi en compte un phénomène de dégradation naturelle de TNF- $\alpha$  pendant l'incubation. De plus nos résultats ont finalement permis d'établir une loi de correction intégrant ces artefacts et qui est peut être adaptée à toutes les nanoparticules et biomolécules d'intérêt.



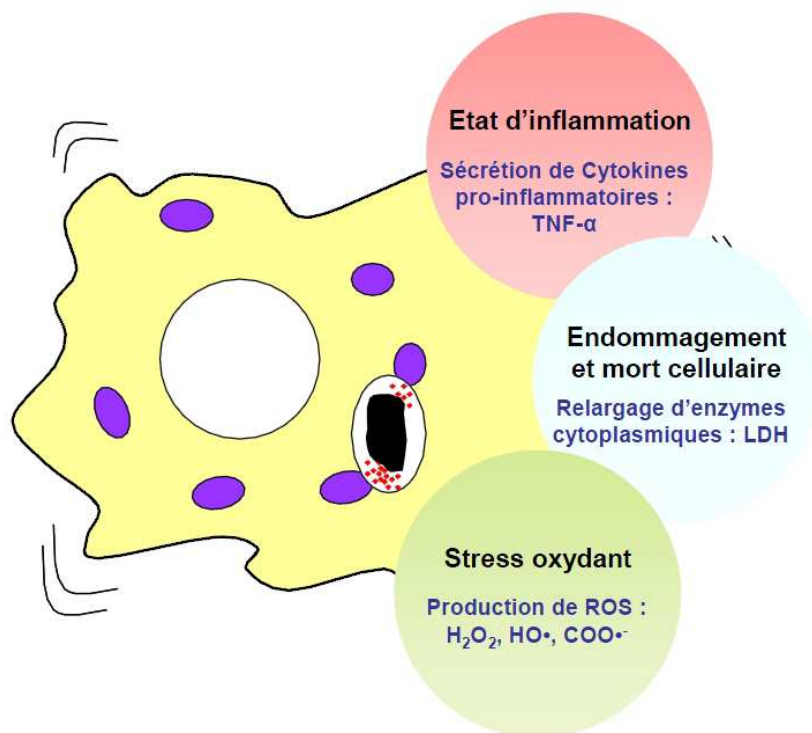
---

# CONCLUSION-PERSPECTIVES

Dans les pays industrialisés le marché des nanotechnologies est en pleine expansion. Les nanoparticules possèdent des propriétés remarquables qui permettent d'envisager de larges applications industrielles, tels que l'agro-alimentaire, la cosmétique ou le secteur de la santé. Malgré toutes ces potentialités technologiques des questions justifiées se posent sur l'impact toxicologique direct pour la population et l'environnement. Ces interrogations sont justifiées compte-tenu du manque d'évaluations toxicologiques et du recul dont nous disposons vis à vis de ces matériaux récents. Actuellement sur les 80000 nouveaux nanomatériaux produits seulement 530 ont fait l'objet d'une étude de toxicité biologique avant leur mise sur le marché (Neal 2008). C'est pourquoi la demande d'évaluation toxicologique est de plus en plus demandée et justifiée de la part des industriels et ce d'autant plus après les effets nocifs imputés à l'amiante.

Notre étude s'est portée sur les particules de boehmite  $\text{AlOOH}$ . La boehmite est un précurseur de l'alumine  $\alpha$  et  $\gamma$  qui ont de nombreuses applications : abrasifs, matériaux réfractaires, isolants... Malgré une utilisation importante de ce matériau, peu d'études au sujet de sa toxicité ont été menées. La littérature recense un projet allemand « Nanocare » et deux publications (Pauluhn 2009 ; Pauluhn 2011). Ces auteurs ont montré après inhalation des particules par des rats une augmentation de l'inflammation principalement due à la taille des agglomérats de particules. Dans ce contexte, il semble déterminant d'étudier plus spécifiquement la biotoxicité des particules de boehmite.

Notre travail a donc eu pour but d'enrichir les connaissances sur les effets biologiques d'un type particulier de nanoparticules de boehmite lors de contacts *in vitro* avec une lignée de macrophages (RAW 264.7). Les macrophages représentent en effet la première ligne de défense de l'organisme dans un contexte d'exposition par voie respiratoire, de part leur fonction propre de phagocytose.



**Figure 149 : Principe de l'évaluation de l'activité biologique de particules de boehmite sur des macrophages (lignée RAW 264.7) (Bouhmadi 2009)**

L'objectif principal était d'évaluer et de comprendre les corrélations potentielles entre les caractéristiques physico-chimiques des différentes particules de boehmite (particules industrielles et élaborées par synthèse hydrothermale) sur les effets biologiques engendrés.

<b>Poudres industrielles</b>	<b>Poudres élaborées par synthèse hydrothermale</b>
Disperal	1
CAM 9010	2
CAM9015	3
CAM9060	4
V250	5
Bulky	6
Disperal « dustiness »	7
Bulky broyée	8

**Tableau 23 : Récapitulatif des différentes poudres étudiées**



La démarche de l'étude fut la suivante : dans un premier temps nous avons réalisé les caractérisations physico-chimiques des nanoparticules étudiées puis analysé leur état d'agglomération dans les milieux d'exposition (milieu de culture). Dans un second temps sur les mêmes particules nous avons évalué leur toxicité biologique selon les paramètres représentés dans la Figure 149. Enfin, dans le cadre du concept « corona » émergent, nous avons étudié les possibles interactions entre le TNF- $\alpha$  qui peut être produit lors d'une réponse inflammatoire et un type spécifique de boehmite nanométrique (disperal), Cette dernière étude a permis de confirmer l'implication d'un phénomène d'adsorption de cette biomolécule à la surface des particules, induisant un biais dans les résultats de dosages ELISA de cette cytokine (sous-estimation voire faux négatif).

- Caractéristiques physico-chimiques

Les principales caractéristiques physico-chimiques des particules (taille, surface, morphologie, composition chimique, état de surface et activité radicalaire) ont été déterminées à l'aide de différentes techniques analytiques (Granulométrie laser, BET, observations au MEB, DRX, ICP, XPS et RPE). De plus les différents post-traitements ont permis de modifier la taille des particules étudiées soit en permettant de récupérer les fractions fines, soit en broyant les poudres ou enfin en les désagglomérant grâce aux ultrasons et donc d'évaluer plus spécifiquement l'impact de la taille lors de l'évaluation biologique.

Les particules industrielles et réalisées par synthèse hydrothermale se caractérisent par des différences notables que ce soit au niveau de la forme des particules primaires qu'au niveau de la surface spécifique beaucoup plus élevée pour les particules réalisées par synthèse hydrothermale.

La capacité des particules à rompre des liaisons et à générer des radicaux libres extrêmement réactifs ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ) est un paramètre fondamental de l'étude de l'activité biologique des particules. En effet, par transposition au milieu biologique, ces radicaux peuvent être à l'origine de dommages cellulaires irréversibles par réaction avec les composants cellulaires.

Dans notre étude, l'activité radicalaire des particules industrielles de boehmite se manifeste systématiquement par des signaux RPE à peine détectables et proches du bruit de fond. Les particules réalisées par synthèse hydrothermale n'ont pas été évaluées sur ce point.

	<b>Particules industrielles de boehmite</b>	<b>Particules de boehmite synthétisées</b>
<b>Taille et surface</b>	Echantillons polydisperses ( $D_{50} < 10\mu\text{m}$ , excepté la dispersal et la V250) ; surface spécifique élevée ( $S_p > 100 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ )	Echantillons polydisperses ( $2\mu\text{m} < D_{50} < 160\mu\text{m}$ ) ; surface spécifique très élevée ( $S_p$ majoritairement $> 180 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ )
<b>Morphologie</b>	Forme sphérique pour la dispersal et la V250 Forme de plaquettes pour les CAM et la bulky	Particules grossières de formes aléatoires
<b>Structure cristalline</b>	Taille des cristallites $< 15\text{nm}$ excepté la bulky (54nm)	Taille des cristallites $< 15\text{nm}$
<b>Impuretés Métalliques</b>	Silicium, sodium, calcium, titane, zirconium, phosphate, fer et plomb (bulky) de l'ordre de la dizaine de ppm	Nickel, calcium, titane, zinc, fer et plomb de l'ordre de la dizaine de ppm et sodium (millier de ppm)

**Tableau 24: Principales caractéristiques des différents types de particules de boehmite étudiés**

- **Activité biologique**

L'activité biologique de chaque poudre a été déterminée *in vitro* après contacts cellulaires sur une lignée de macrophages de souris, la RAW 264.7 en évaluant différents paramètres : le paramètre morphologique, l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ), la mort cellulaire ou perte d'intégrité membranaire (LDH) et le stress oxydant ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en comparaison à un témoin positif de toxicité établi : le DQ12 (Tableau 25).

Les résultats ont montré que les poudres industrielles présentent un effet inflammatoire modéré (entre 400 et 600  $\text{pg.mL}^{-1}$  contre 1000 à 1400  $\text{pg.mL}^{-1}$  pour le témoin positif de toxicité) et une absence de cytotoxicité (entre 15 et 22%, 18% pour le témoin négatif cellules témoins non traitées) et de stress oxydant (en dessous du témoin négatif). Les poudres nanométriques obtenues après traitement montrent au contraire une réponse pro-inflammatoire importante se traduisant par une production importante de TNF- $\alpha$  (entre 2300 et 2900  $\text{pg.mL}^{-1}$ ) ainsi qu'une cytotoxicité plus élevée (25 à 35%). En ce qui concerne les poudres obtenues par synthèse hydrothermale nous avons observé un effet inflammatoire également significatif ( $> 1400 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) ainsi qu'une cytotoxicité plus élevée (20 à 30%) mais sans effet stress oxydant.

L'absence de stress oxydant est confirmée par l'incapacité des particules à former des radicaux libres. Les analyses RPE sont donc indissociables des études sur l'activité biologique des cellules au contact des particules et ces observations confirment la nécessité de bien mettre en parallèle les données biologiques aux données physico-chimiques.

La principale constatation qui est ressortie de cette étude sur l'activité biologique est que la production de TNF- $\alpha$  ainsi que la cytotoxicité augmente généralement lorsque la taille des agglomérats diminue. Nous n'avons pas observé d'effet de la pureté ou à la taille des particules primaires. Ces résultats viennent compléter les études réalisées par Pauluhn qui a montré lui aussi un effet de la taille des agglomérats de boehmite sur l'activité biologique. Il est donc important quelque soit la nature ou la taille des particules de réaliser une évaluation de son activité biologique.

- Interactions nanoparticules-protéines

Le deuxième volet de ma thèse s'est intéressé plus particulièrement au concept émergent de « la corona » qui est une couche dynamique à la surface des nanoparticules adsorbant des protéines provenant des milieux biologiques immédiatement lors du contact avec les systèmes vivants. Dans cette optique notre objectif a été de caractériser au cours des tests de toxicité les artefacts de dégradation et d'adsorption du TNF- $\alpha$  sur un type particulier de particules de boehmite (disperal). Les expériences menées ont permis de mettre en avant une dégradation du TNF- $\alpha$  dépendante du temps, de la température usuelle de 37°C, de la nature du support (plastique ou verre). En outre nous avons observé de façon concomitante un phénomène d'adsorption sur la paroi des puits de culture ainsi qu'à la surface des nanoparticules. Ces différents facteurs entraînent le plus souvent une sous estimation de la valeur réelle de TNF- $\alpha$  libéré durant les tests *in vitro*, pouvant conduire à la génération de faux-négatifs en fonction du type de nanoparticule et de biomolécule (Val 2009).

Nos résultats introduisent aussi une loi de correction qui prend en compte ces artefacts de dégradation et d'adsorption et qui peut être adaptée à tous types de nanoparticules et autres biomolécules.

Ce travail ouvre plusieurs perspectives de recherches au vu de la pluridisciplinarité de celui-ci.

A court terme, il serait judicieux d'introduire systématiquement l'évaluation de l'aspect génotoxicité (altérations primaires de l'ADN) et de compléter cet aspect par une étude de la fragmentation internucléosomale de l'ADN caractéristique de l'apoptose. Dans les cas de

figures où la cytotoxicité et le niveau d'apoptose seraient importants, il serait envisageable de procéder à une évaluation des protéines effectrices de l'apoptose que sont les caspases (activité pan-caspases versus caspase-3 activée), ceci afin de comprendre quel type de voie d'activation apoptotique est impliquée : voie extrinsèque des récepteurs ou voie intrinsèque mitochondriale. Ceci nous permettrait au final de disposer d'une plateforme d'évaluation de la toxicité biologique très complète.

Par ailleurs, il semble important d'approfondir les connaissances dans le domaine de l'interaction particules/cellules. Il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres types cellulaires potentiellement impliqués au niveau du tractus respiratoire tels que les cellules épithéliales ou pneumocytes (Okeson et al. 2003; Hetland et al. 2004) ou des modèles de cocultures associant macrophages et cellules épithéliales (Klein et al. 2011) (Diabaté et al. 2002, Diabaté et al. 2002; Wottrich et al. 2004). Ces développements permettraient une étude de la toxicité des nanoparticules de boehmite plus complètes et représentatives des conditions *in vivo*, notamment au niveau de la barrière alvéolo-capillaire.

Enfin, un point qu'il serait intéressant d'appliquer c'est l'introduction au niveau de l'évaluation biologique de méthodologies d'étude plus quantitatives de l'internalisation (par microscopie à fluorescence et/ou confocale, mesures quantitatives par fluorimétrie) pour établir plus précisément l'impact du niveau « d'uptake » cellulaire sur l'activité biologique. Ce type de méthodologie n'est pas envisageable sur des particules industrielles non fluorescentes. Il faudrait alors plutôt envisager l'utilisation de sondes fluorescentes qui marqueraient les phagolysosomes dans un contexte de phagocytose, mais ce n'est pas forcément non plus la meilleure approche pour des nanoparticules sauf si il y a présence d'agglomérats. La meilleure approche serait la microscopie électronique à transmission mais il s'agit là d'analyses longues et coûteuses, et seulement semi-quantitatives.

Enfin, l'étude des interactions spécifiques entre les particules et les composants du milieu de culture ainsi que des biomolécules produites par les cellules au cours des contacts cellules/particules, doit être poursuivie et compléter la caractérisation physico-chimique des particules d'intérêt (adsorption des protéines, désagglomération...). Dans ce cadre nous nous proposons d'approfondir le concept de corona en élargissant aux autres biomolécules qui sont usuellement évaluées lors des tests *in vitro* : LDH, ROS, autres cytokines d'intérêts... L'objectif étant de prendre systématiquement en compte ce phénomène d'adsorption lors des évaluations de toxicité, ceci afin d'aboutir à des résultats non biaisés.

Particules industrielles de boehmite									
Paramètres de la réponse cellulaire	Paramètres	Disperal	CAM9010	CAM9015	CAM9060	V250	Bulky	Disperal « dustiness »	Bulky broyée
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	+	+	+	+	+	++++	++++	++++
Mort cellulaire	LDH	-	-	-	-	-	-	+++	+++
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	-	-	-	-	-	-	-	-
Particules de boehmite synthétisées avant dispersion									
Paramètres de la réponse cellulaire	Paramètres	1	2	3	4	5	6	7	8
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mort cellulaire	LDH	+	+	+	+	+	+	+	+
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	-	-	-	-	-	-	-	-
Particules de boehmite synthétisées après dispersion									
Paramètres de la réponse cellulaire	Paramètres	1	2	3	4	5	6	7	8
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Mort cellulaire	LDH	++	++	++	+++	++	++	++	++
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	-	-	-	-	-	-	-	-
Témoin négatif et positif de toxicité									
Paramètres de la réponse cellulaire	Paramètres	Cellules seules	DQ12						
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	-	++++						
Mort cellulaire	LDH	-	++++						
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	+	+						

		TNF- $\alpha$	LDH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Nul	-	<250 pg.mL <sup>-1</sup>	<20%	ROS : <0,8 nmol TOX : <100%
Modéré	+	Entre 250 et 500 pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 20 et 22%	
Important	++	Entre 500 et 900 pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 22 et 25%	
Très important	+++	Entre 900 et 1400pg.mL <sup>-1</sup>	Entre 25 et 35%	
Extrêmement important	++++	>1400pg.mL <sup>-1</sup>	>35%	

***Tableau 25 : Activité biologique globale des particules de boehmite***







# BIBLIOGRAPHIE

AFSSAPS, 2011. *Recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire*,

Afsset, 2006. Les nanomatériaux, effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. , Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail(n°2005-010).

Aitken, R.J., Creely,, K.S. & Tran, C.L., 2004. HSE - Science and research - RR274 - Nanoparticles: An occupational hygiene review.

Akhtar, U.S. et al., 2010. Cytotoxic and proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles.*Inhalation Toxicology*, 22(S2), p.37-47.

Alapetite, C., 1998. [Individual radiosensitivity and DNA repair proficiency: the value of the comet assay]. *Cancer Radiother*, 2(5), p.534-40.

Alexander, P., 1991. Ultrafine titanium-dioxide makes the grade. *Manufacturing Chemist*, 62(7), p.21-&.

Alfrey, A.C., LeGendre, G.R. & Kaehny, W.D., 1976. The dialysis encephalopathy syndrome.Possible aluminum intoxication.*The New England Journal of Medicine*, 294(4), p.184-188.

Alfrey, A.C., Mishell, J.M., et al., 1972. Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis. *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs*, 18(0), p.257-261, 266-267.

Alfrey, A., Hegg, A. & Craswell, P., 1980.Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure.*The American Journal of Clinical Nutrition*, 33(7), p.1509 -1516.

Alvarez-Roman, R. et al., 2004. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 99(1), p.53-62.

Amin, S., 2004. *TNF alpha et maladies auto immunes. Applications au lupus erythemateux disseminé canin*. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard - Lyon I.

Araki, N., 2006. Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Frontiers in Bioscience*, 11, p.1479-1490.

Auffan, M., 2007. *Nanoparticules d'oxydes métalliques: relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques*. Thèse de doctorat. Université de Paul cézanne Aix-Marseille III.

Bakir, A.A. et al., 1986. Acute fatal hyperaluminemic encephalopathy in undialyzed and recently dialyzed uremic patients. *ASAIO Transactions / American Society for Artificial Internal Organs*, 32(1), p.171-176.

Barus, C., 2008. *Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieu homogène et biphasique - Application aux produits dermocosmétiques*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse III - Paul Sabatier.

Bauer et al., 1998. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square ( $\chi^2$ ) not a gaussian distribution. *Mutation research-fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 398(1-2), p.101-110.

Belnou, F., 2002. *Mullitisation et inhibition du retrait dans les systèmes multi oxydes*.

Boczkowski, J. & Hoet, P, 2010. What's new in nanotoxicology? Implications for public health from a brief review of the 2008 literature. *Nanotoxicology*, 4(1), p.1-14.

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

Bradley, J.R., 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, 214(2), p.149-160.

Brown, J., Zeman, K. & Bennett, W., 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care*

---

*Medecine*, 166(9), p.1240-1247.

Bruch, J., 2004. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207(3), p.203-216.

Bruch, J. et al., 2004a. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health*, 207(3), p.203-16.

Burlinson, B. et al., 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(1), p.31-35.

Buzea, C., Pacheco, I.I. & Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), p.MR17-MR71.

Caiut, J.M.A. et al., 2009. Elaboration of boehmite nano-powders by spray-pyrolysis. *Powder Technology*, 190(1-2), p.95-98.

Cao, G., 2004. *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*, Imperial College Press.

Carmaux, S., 2008. *Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteurs*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy I.

Castellano, F., Chavrier, P. & Caron, E., 2001. Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol*, 13(6), p.347-55.

Castet, S. et al., 1993. Boehmite Solubility and Aqueous Aluminum Speciation in Hydrothermal Solutions (90-350-Degrees-C) - Experimental-Study and Modeling. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 57(20), p.4869-4884.

Cedervall, T. et al., 2007. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), p.2050 -2055.

Chattopadhyay, D. & Patel, B., 2011. Modification of Cotton Textiles with Nanostructural Zinc Particles. *Journal of Natural Fibers*, 8(1), p.39-47.

Chen, W., Zhang, J. & Joly, A., 2004. Optical properties and potential applications of doped semiconductor nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4(8), p.919-947.

Claude Ostiguy et Brigitte Roberge,, 2008. Guide de bonnes pratiques favorisant la gestion des risques reliés aux nanoparticules de synthèse.

Collins, A., 2004. The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3), p.249-261.

Commissariat à l'Énergie Atomique, 2008. Recherches dans les domaines de la production et de l'utilisation sécurisées des nanomatériaux; Applications aux nouvelles technologies de l'énergie.

Compte-rendu débat INERIS – Associations, 2008. La toxicité des nanomatériaux.

Conner, S. & Schmid, S., 2003a. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), p.37-44.

Connor, E. et al., 2005. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3), p.325-327.

Corre, S., 2005. *Régulation UV-dépendante des gènes de la pigmentation: implication du facteur de transcription USF-1 (Upstream Stimulating Factor 1)*. Thèse de doctorat. Université de Rennes I.

Couvreur, P. & Puisieux, F., 1993. Nanoparticles and Microparticles for the delivery of Polypeptides and Proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 10(2-3), p.141-162.

Dekati, L., 2003. *ELPI User Manual*,

Delaharpe, J. & Nathan, C.F., 1985. A Semi-Automated Micro-Assay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Release by Human-Blood Monocytes and Mouse Peritoneal-Macrophages. *Journal of Immunological*

*Methods*, 78(2), p.323-336.

Delattre, J. et al., 2005. *Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques*, Tec & Doc Lavoisier.

Dell'Orco, D. et al., 2010. Modeling the Time Evolution of the Nanoparticle-Protein Corona in a Body Fluid. *Plos one*, 5(6), p.e10949.

Derfus, A., Chan, W. & Bhatia, S., 2004. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*, 4(1), p.11-18.

Diabaté, S. et al., 2002. In vitro effects of incinerator fly ash on pulmonary macrophages and epithelial cells. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 204(5-6), p.323-326.

Dopp, E., Yadav, S., et al., 2005. ROS-mediated genotoxicity of asbestos-cement in mammalian lung cells in vitro. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, p.9.

Drescher, D. et al., 2011. Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(5), p.1367-1373.

Edwardson, J.A. et al., 1986. Aluminosilicates and the ageing brain: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ciba Foundation Symposium*, 121, p.160-179.

Ekoue, A., 2002. *Caractérisations électriques et physico-chimiques des oxydes sur Carbure de Silicium: Application à une technologie MOSFETs*. Thèse de doctorat. INSA de Lyon.

Feghali, C.A. & Wright, T.M., 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 2, p.d12-26.

Feldman, R.G., 1982. Central and peripheral nervous system effects of metals: a survey. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, 92, p.143-166.

Fenoglio, I et al., 2006b. Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or

scavenging activity? *Free Radical Biology and Medicine*, 40(7), p.1227-1233.

Fenoglio, I., Fonsato, S. & Fubini, B., 2003c. Reaction of cysteine and glutathione (GSH) at the freshly fractured quartz surface: a possible role in silica-related diseases? *Free Radic Biol Med*, 35(7), p.752-62.

Fenoglio, Ivana, Fonsato, Stefania & Fubini, Bice, 2003. Reaction of cysteine and glutathione (GSH) at the freshly fractured quartz surface: a possible role in silica-related diseases? *Free Radical Biology & Medicine*, 35(7), p.752-762.

Flendrig, J.A., Kruis, H. & Das, H.A., 1976. Letter: Aluminum and dialysis dementia. *Lancet*, 1(7971), p.1235.

Fubini, B., 1998. Surface chemistry and quartz hazard. *Annals of Occupational Hygiene*, 42(8), p.521-530.

Fubini, B., Mollo, L. & Giamello, E., 1995d. Free-radical generation at the solid/liquid interface in iron-containing minerals. *Free radical research*, 23(6), p.593-614.

Fubini, B. & Bruch, J., 2004e. Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int J Hyg Environ Health*, 207(2), p.89-104.

Fubini, B. & Hubbard, A., 2003f. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*, 34(12), p.1507-16.

Fubini, Bice & Hubbard, Andrea, 2003g. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(12), p.1507-1516.

Gaffet, E., 2011. Nanomatériaux : Une revue des définitions, des applications et des effets sur la santé. Comment implémenter un développement sûr. *Comptes Rendus Physique*, 12(7), p.648-658.

Ganrot, P.O., 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environmental Health Perspectives*, 65, p.363-441.

Garnier, R., 2005. Toxicité du plomb. *Toxicologie-Pathologie*, 2(2), p.67-88.

Geys, J., Nemery, B. & Hoet, PHM, 2010. Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: Better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicology in Vitro*, 24(2), p.620-629.

Goergen, J., MARC, A. & ENGASSER, J., 1993. Determination of Cell-Lysis and Death Kinetics in Continuous Hybridoma Cultures from the Measurement of Lactate-Dehydrogenase Release. *Cytotechnology*, 11(3), p.189-195.

Goodman, C. et al., 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry*, 15(4), p.897-900.

Gorsky, J.E. et al., 1979. Metabolic balance of aluminum studied in six men. *Clinical Chemistry*, 25(10), p.1739-1743.

Gourirer-Fréry, C., 2003. *Aluminium: quels risques pour la santé? Synthèse des études épidémiologiques*, Institut de Veille Sanitaire.

Governa, M. et al., 2005. Variability of biological effects of silicas: different degrees of activation of the fifth component of complement by amorphous silicas. *Toxicol Appl Pharmacol*, 208(1), p.68-77.

Greger, J.L. & Baier, M.J., 1983. Excretion and retention of low or moderate levels of aluminium by human subjects. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 21(4), p.473-477.

Gurav, A. et al., 1993. Aerosol processing of materials. *Aerosol Science and Technology*, 19(4), p.411-452.

Gurr, J. et al., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213(1-2), p.66-

73.

Gwinn, M.R. & Vallyathan, V., 2006. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 9(1), p.27-39.

Halliwell, B. & Gutteridge, J., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine* 3e éd., Oxford University Press, USA.

Helfen, A., 2004. *Elaboration et caractérisation d'un nouvel électrolyte solide pour les piles à combustible:  $\delta$ -Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*. Thèse de doctorat. Université de Marne la Vallée.

Hervé-Bazin, B. & Collectif, 2007. *Les nanoparticules: Un enjeu majeur pour la santé au travail?*, EDP Sciences.

Hetland, R.B. et al., 2004. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 18(2), p.203-212.

Hirn, S. et al., 2011. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 77(3), p.407-416.

Horie, M. et al., 2009. Protein Adsorption of Ultrafine Metal Oxide and Its Influence on Cytotoxicity toward Cultured Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22(3), p.543-553.

Ibasetta, N., 2007. *Etude expérimentale et modélisation de l'émission d'aérosols ultrafins lors du déversement de poudres nanostructurées*. Institut national polytechnique de Toulouse.

Ibnlkhayat Idrissi, M., 2002. *Etude expérimentale des effets de l'aluminium chez le rat et la souris investigation clinique chez les hémodialysés*. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdallah.

INERIS, 2007. Institut national de l'environnement industriel et des risques.



Jain, A.K. et al., 2007. Carbon nanotubes and their toxicity. *Nanotoxicology*, 1(3), p.167-197.

Jean, S. et al., 2001. The expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365-nm UVA: study by cDNA arrays and real-time quantitative RT-PCR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1522(2), p.89-96.

Kamat, P., 2002. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. *Journal of Physico chemistry B*, 106(32), p.7729-7744.

Keskinen, J., Pietarinen, K. & Lehtimäki, M., 1992. Electrical Low-Pressure Impactor. *Journal of Aerosol Science*, 23(4), p.353-360.

Klein, S.G. et al., 2011. Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 25(8), p.1516-1534.

Kloprogge, J. et al., 2006. XPS study of the major minerals in bauxite: Gibbsite, bayerite and (pseudo-)boehmite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296(2), p.572-576.

Kreyling, W G et al., 2002b. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 65(20), p.1513-1530.

Kroll, A. et al., 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), p.370-377.

Kuhlbusch, T.A.J. et al., 2009. NanoCare: Health related aspects of nanomaterials.

Lademann, J. et al., 2011. Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(3), p.465-468.

Larno, V., 2002. *Réponses génétiques et physiologiques de populations de Chevaine (Leuciscus cephalus) à la contamination chimique dans le bassin du Rhône*. Thèse de doctorat.

Université Claude Bernard - Lyon I.

Leclerc, L. et al., 2010. Quantification of microsized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhalation Toxicology*, 22(13), p.1091-1100.

Li, N. et al., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental Health Perspectives*, 111(4), p.455-460.

Limbach, L. et al., 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Science & Technology*, 39(23), p.9370-9376.

Lin, W.S. et al., 2006. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(3), p.252-259.

Lu, L., Sui, M. & Lu, K., 2000. Superplastic extensibility of nanocrystalline copper at room temperature. *Science*, 287(5457), p.1463-1466.

Lundborg, M. et al., 2007. Aggregates of ultrafine particles modulate lipid peroxidation and bacterial killing by alveolar macrophages. *Environmental Research*, 104(2), p.250-257.

Luther, W., 2004. Industrial application of nanomaterials-chances and risks.

Lynch, I. & Dawson, K. A., 2008. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, 3(1-2), p.40-47.

Marjamaki, M. et al., 2000. Performance evaluation of the electrical low-pressure impactor (ELPI). *Journal of Aerosol Science*, 31(2), p.249-261.

Mavon, A. et al., 2007. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(1), p.10-20.

McLachlan, D.R. et al., 1991. Would decreased aluminum ingestion reduce the incidence of Alzheimer's disease? *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 145(7), p.793-804.

Mélessopoulos, A., 1998. La peau; structure et physiologie; Alexandre Mélessopoulos,

Christine Levacher; préface de Ladislav Robert.

Messing, G., Zhang, S. & Jayanthi, G., 1993. Journal of the american ceramic powder synthesis by spray-pyrolysis. *Journal*, 76(11), p.2707-2726.

Moalic, V., Mercier, B. & Ferec, C., 2004. Technologie Luminex(TM): principe, applications, et perspectives. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 19(4), p.181-187.

Moghimi, S., Hunter, A. & Murray, J., 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb journal*, 19(3), p.311-330.

Moller, W. et al., 2008. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(4), p.426-432.

Monleau, M., 2005. *Biocinétique et toxicologie de l'uranium chez le rat après inhalations aiguës et répétées*. Thèse de doctorat. Aix-Marseille II: Université de la Méditerranée.

Monteiro-Riviere, N., Inman, A. & Zhang, L., 2009. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), p.222-235.

Moore, A. et al., 1995. Apoptosis in Cho Cell Batch Cultures - Examination by Flow-Cytometry. *Cytotechnology*, 17(1), p.1-11.

Murdock, R. et al., 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to In vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences*, 101(2), p.239-253.

Murphy, C. et al., 2005. Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(29), p.13857-13870.

Music, S., Dragevic, D. & Popovic, S., 1999. Hydrothermal crystallization of boehmite from freshly precipitated aluminium hydroxide. *Materials Letters*, 40(6), p.269-274.

Naskar, M.K. & Chatterjee, M., 2005. Boehmite nanoparticles by the two-reverse emulsion

technique. *Journal of the American Ceramic Society*, 88(12), p.3322-3326.

Neal, A., 2008. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology*, 17(5), p.362-371.

Nel, A et al., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7), p.543-557.

Nemmar, A. et al., 2001. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(9), p.1665-1668.

Nguyen, T.N.T., 2009. *Implication des canaux K<sup>+</sup> dans les processus de réparation del'épithélium respiratoire sain et fibrose kystique*. Université de Montréal.

Niedergang, F. & Chavrier, P., 2004. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol*, 16(4), p.422-8.

Nohynek, G. et al., 2007. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical reviews in toxicology*, 37(3), p.251-277.

Oberdorster, G., Ferin, J. & Lehnert, B., 1994. Correlation between particle-size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental Health Perspectives*, 102, p.173-179.

Oberdorster, G. et al., 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*, 16(6-7), p.437-445.

Oberdorster, G. et al., 2002c. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of toxicology and environmental health-Part A*, 65(20), p.1531-1543.

Oberdorster, G., 2000. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 358(1775), p.2719-2739.

Oberdorster, G., Oberdorster, E. & Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), p.823-839.

Oberdorster, G., Stone, V. & Donaldson, K., 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1(1), p.2-25.

Oberdörster, Günter, 2002. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhalation Toxicology*, 14(1), p.29-56.

OECD guideline for the testing oh chemicals, 1997. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test.

Okeson, C.D. et al., 2003. Impact of the composition of combustion generated fine particles on epithelial cell toxicity: influences of metals on metabolism. *Chemosphere*, 51(10), p.1121-1128.

Olive, P., Banath, J. & Durand, R., 1990. Heterogeneity in Radiation-Induced Dna Damage and Repair in Tumor and Normal-Cells Measured Using the Comet Assay. *Radiation Research*, 122(1), p.86-94.

Orts-Gil, G. et al., 2011. Characterisation of silica nanoparticles prior to in vitro studies: from primary particles to agglomerates. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(4), p.1593-1604.

Ostiguy, 2006. Les effets à la santé reliés aux nanoparticules.

Ostiguy, C., 2010. Les nanoparticules de synthèse - Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST - 2e édition.

Papageorgiou, I. et al., 2007. Genotoxic effects of particles of surgical cobalt chrome alloy on human cells of different age in vitro. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 619(1-2), p.45-58.

Passagne, I., 2011. Etudes de la génotoxicité de nanoparticules métalliques. *Bulletin de*

*veille scientifique: Santé/Environnement/Travail.*

Pauluhn, J., 2011. Poorly soluble particulates: Searching for a unifying denominator of nanoparticles and fine particles for DNEL estimation. *Toxicology*, 279(1-3), p.176-188.

Pauluhn, J., 2009. Retrospective analysis of 4-week inhalation studies in rats with focus on fate and pulmonary toxicity of two nanosized aluminum oxyhydroxides (boehmite) and pigment-grade iron oxide (magnetite): The key metric of dose is particle mass and not particle surface area. *Toxicology*, 259(3), p.140-148.

Pernot-Gehin, A., 2007. *Etude des procédés de colmatage d'alliages d'aluminium anodisé.* Thèse de doctorat. Nancy I: Université Henri Poincaré.

Perry, G., Cash, A.D. & Smith, M.A., 2002. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2(3), p.120-123.

Peryea, F. & Kittrick, J., 1988. Relative solubility of corundum, gibbsite, boehmite, and diasporite at standard state conditions. *Clays and clay minerals*, 36(5), p.391-396.

Polizzi, S. et al., 2002. Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 23(6), p.761-774.

Poser, I., Rahman, Q., Lohani, M., et al., 2004. Modulation of genotoxic effects in asbestos-exposed primary human mesothelial cells by radical scavengers, metal chelators and a glutathione precursor. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 559(1-2), p.19-27.

Pratsinis, S. & Vemury, S., 1996. Particle formation in gases: A review. *Powder Technology*, 88(3), p.267-273.

Prilutski, Y. et al., 1999. Theoretical predictions and experimental studies of self-organized C-60 nanoparticles in water solution and on the support. *European physical journal D*, 9(1-4), p.341-343.

Qi, K. et al., 2006. Self-cleaning cotton. *Journal of Materials Chemistry*, 16(47), p.4567-

4574.

Racher, A., Looby, D. & Griffiths, J., 1990. Use of Lactate-Dehydrogenase Release to Assess Changes in Culture Viability. *Cytotechnology*, 3(3), p.301-307.

Rahman, I., 2002. Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), p.935-942.

Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., et al., 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives*, 110(8), p.797-800.

Rahman, Q. et al., 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives*, 110(8), p.797-800.

Raybaud, P. et al., 2001. Morphology and surface properties of boehmite ( $\gamma$ -AlOOH): A density functional theory study. *Journal of Catalysis*, 201(2), p.236-246.

Réglier, M., *Résonance Paramagnétique Electronique*, Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III).

Renner, A., 2008. *Mise au point de tests « preuve de principe » pour l'étude des inhibiteurs de la Plk1 et caractérisation de la Plk1 en tant que cible dans le traitement des Leucémies Aiguës Myéloïdes*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse III - Paul Sabatier.

Risom, L., Moller, P. & Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation research-fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 592(1-2), p.119-137.

Sadauskas, E. et al., 2009. Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation., 3, p.16-16.

Salmeron, 2008. *Pneumologie*.

Sayes, C. et al., 2004. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano*

*Letters*, 4(10), p.1881-1887.

Simon, M., 2009. *Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro*. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux.

Simon-deckers, A., 2008. *Effets biologiques de nanoparticules manufacturées: influence de leurs caractéristiques*. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).

Singh, S. et al., 2007h. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(2), p.141-151.

Sohal, R.S., Mockett, R.J. & Orr, W.C., 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), p.575-586.

Somasundaran, P. & Krishnakumar, S., 1997. Adsorption of surfactants and polymers at the solid-liquid interface. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 123, p.491-513.

Stanton, M. et al., 1977. Carcinogenicity of fibrous glass- Pleural response in rat in relation to fiber dimension. *Journal of the national cancer institute*, 58(3), p.587-603.

Stuart, L. & Ezekowitz, R., 2005. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity*, 22(5), p.539-550.

Takenaka, S et al., 2006d. Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhalation Toxicology*, 18(10), p.733-740.

Tarantola, M. et al., 2011. Toxicity of gold-nanoparticles: Synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. *Nanotoxicology*, 5(2), p.254-268.

Tice, R. et al., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic



toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), p.206-221.

Tinkle, S. et al., 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environmental Health Perspectives*, 111(9), p.1202-1208.

Turci, F. et al., 2010i. An Integrated Approach to the Study of the Interaction between Proteins and Nanoparticles. *Langmuir*, 26(11), p.8336-8346.

Val, S., 2009. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: Need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhalation Toxicology*, 21, p.115-122.

Vigneshwaran, N. et al., 2006. Functional finishing of cotton fabrics using zinc oxide-soluble starch nanocomposites. *Nanotechnology*, 17(20), p.5087-5095.

Wang, B. et al., 2006. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicology Letters*, 161(2), p.115-123.

Warheit, D.B. et al., 2008. Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol Ther*, 120(1), p.35-42.

Warheit, D.B., 2010. Debunking Some Misconceptions about Nanotoxicology. *Nano Letters*, 10(12), p.4777-4782.

Watanabe, M. et al., 2002. Differences in the effects of fibrous and particulate titanium dioxide on alveolar macrophages of Fischer 344 rats. *Journal of toxicology and environmental health-Part A*, 65(15), p.1047-1060.

Welsch, U., 2004. *Précis d'histologie: Cytologie, histologie, anatomie microscopique*, Tec & Doc Lavoisier.

Witschger O., Fabries J-F., 2005. Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *Hygiène et sécurité du travail*.

Wottrich, R., Diabaté, S. & Krug, Harald F, 2004. Biological effects of ultrafine model

particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207(4), p.353-361.

Wysocki, A.B., 1999. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *The Nursing Clinics of North America*, 34(4), p.777-797, v.

Xia, T. et al., 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano letters*, 6(8), p.1794-1807.

Xia, X.-R., Monteiro-Riviere, N.A. & Riviere, J.E., 2010. An index for characterization of nanomaterials in biological systems. *Nat Nano*, 5(9), p.671-675.

Yang, W., Peters, J. & Williams, R., 2008. Inhaled nanoparticles - A current review. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), p.239-247.

Yoldas, B.E., 1975a. Alumina Gels That Form Porous Transparent Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of Materials Science*, 10(11), p.1856-1860.

Yoldas, B.E., 1975b. Alumina Sol Preparation from Alkoxides. *American Ceramic Society Bulletin*, 54(3), p.289-290.

Yoldas, B.E., 1973. Hydrolysis of Aluminum Alkoxides and Bayerite Conversion. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 23(11), p.803-809.

Yoldas, B.E., 1975c. Transparent Porous Alumina. *American Ceramic Society Bulletin*, 54(3), p.286-288.

Zeyons, O., 2008. *Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement*. Thèse de doctorat. Université Paris IV.

Zhan, G. et al., 2003. Electrical properties of nanoceramics reinforced with ropes of single-walled carbon nanotubes. *Applied physics letters*, 83(6), p.1228-1230.

Zhang, H. et al., 2003. Water-driven structure transformation in nanoparticles at room

temperature. *Nature*, 424(6952), p.1025-1029.

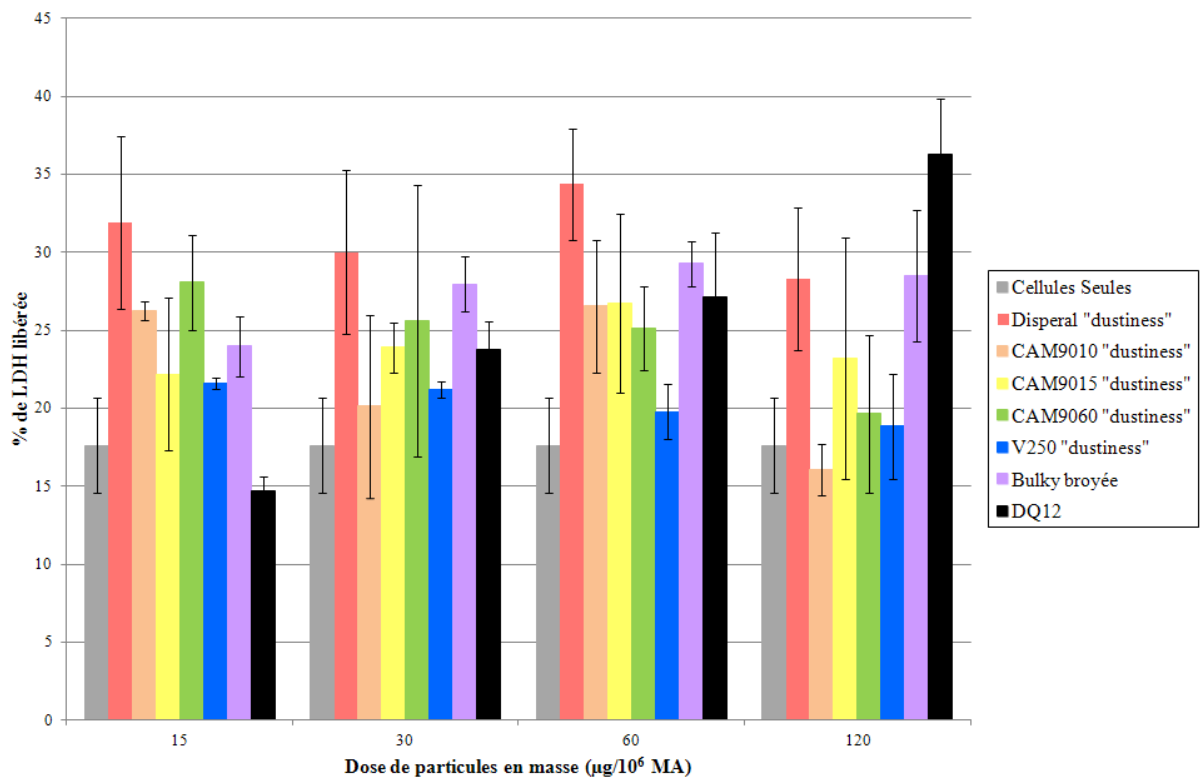


# ANNEXES



# ANNEXE A. EVALUATION BIOLOGIQUE DES PARTICULES DE BOEHMITE « NANOS » EN FONCTION DE LA DOSE EN MASSE

L'ensemble des différents paramètres évalués pour la toxicité biologique des poudres « nanos » est représenté sur les graphiques suivants et exprimés en fonction de la dose en masse de particules.



**Figure 150: LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**

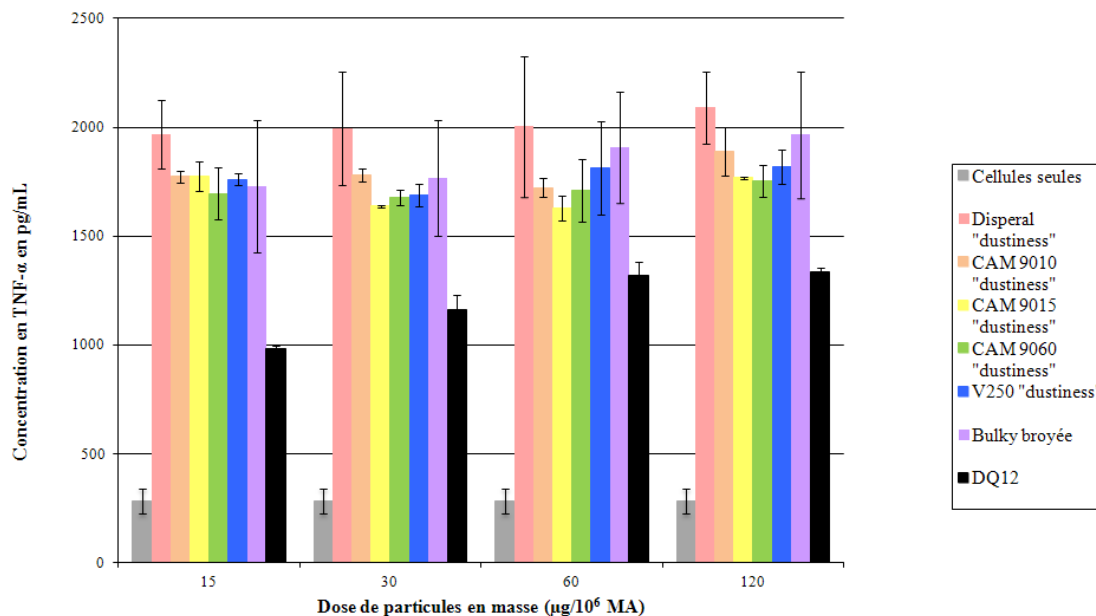


Figure 151 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules de boehmite « nanométriques » après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)

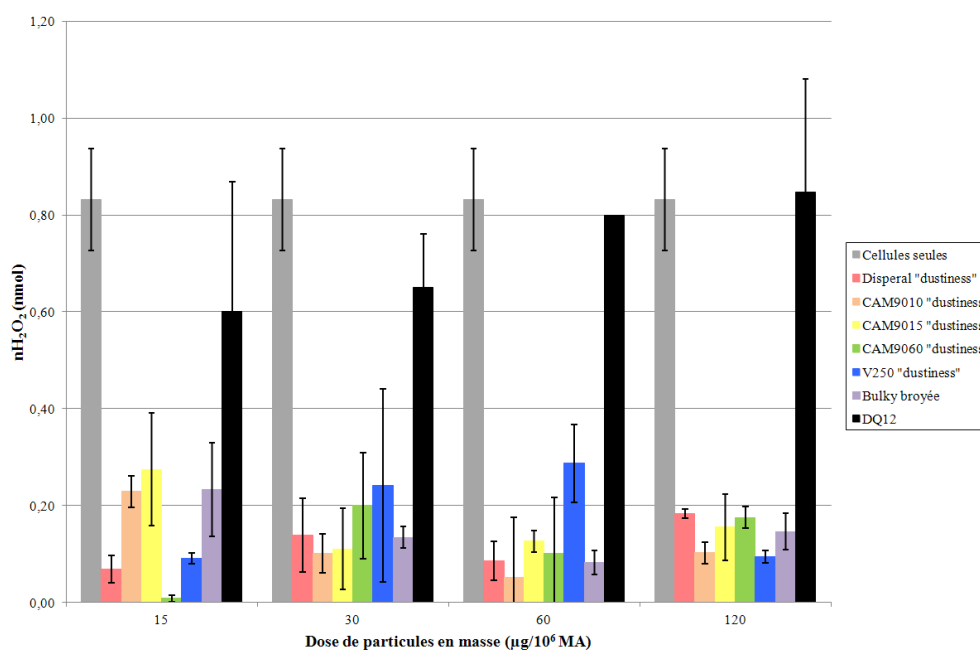
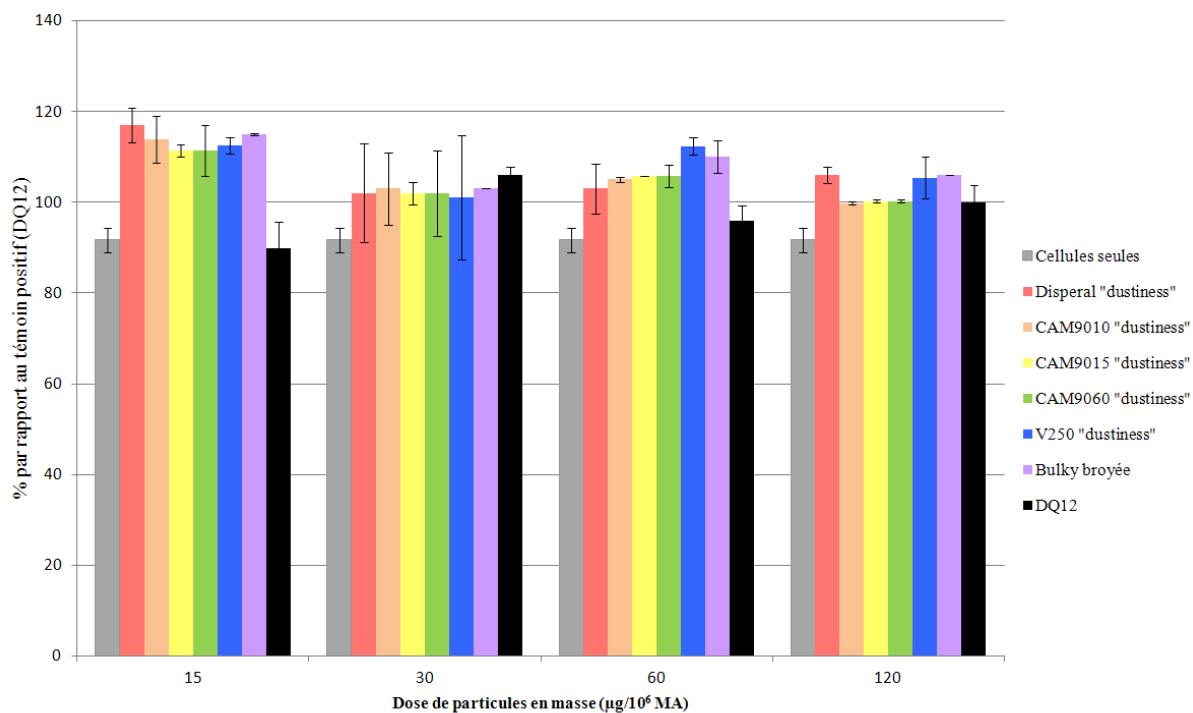


Figure 152 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules « nanométriques » après 90min de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)

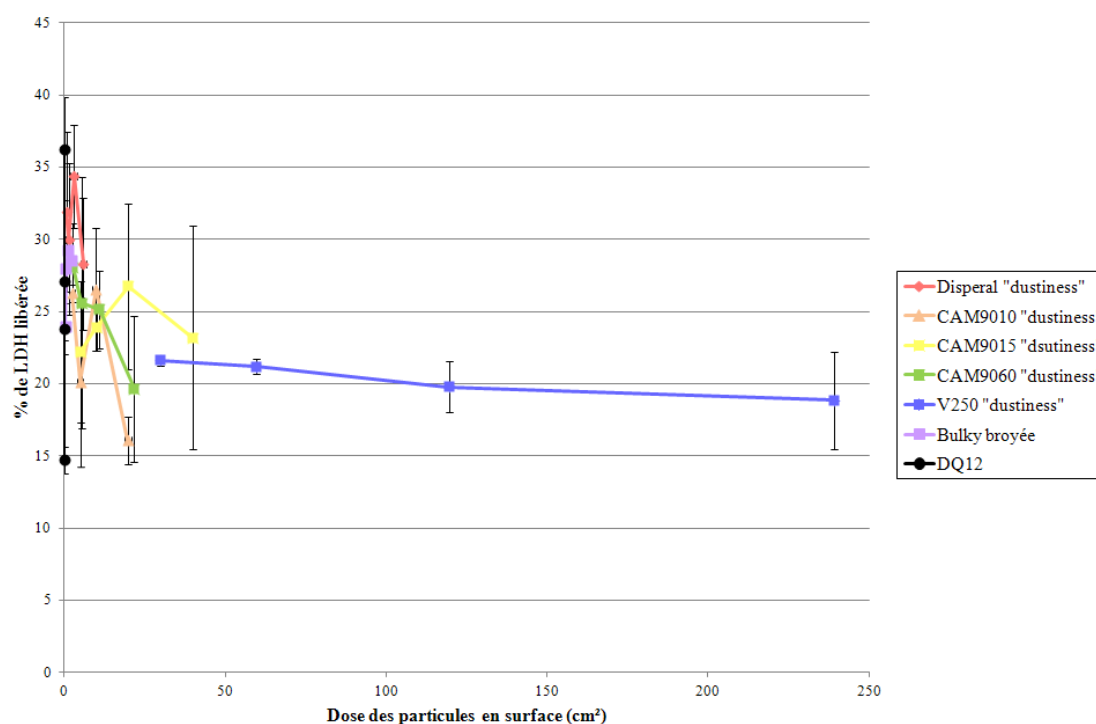




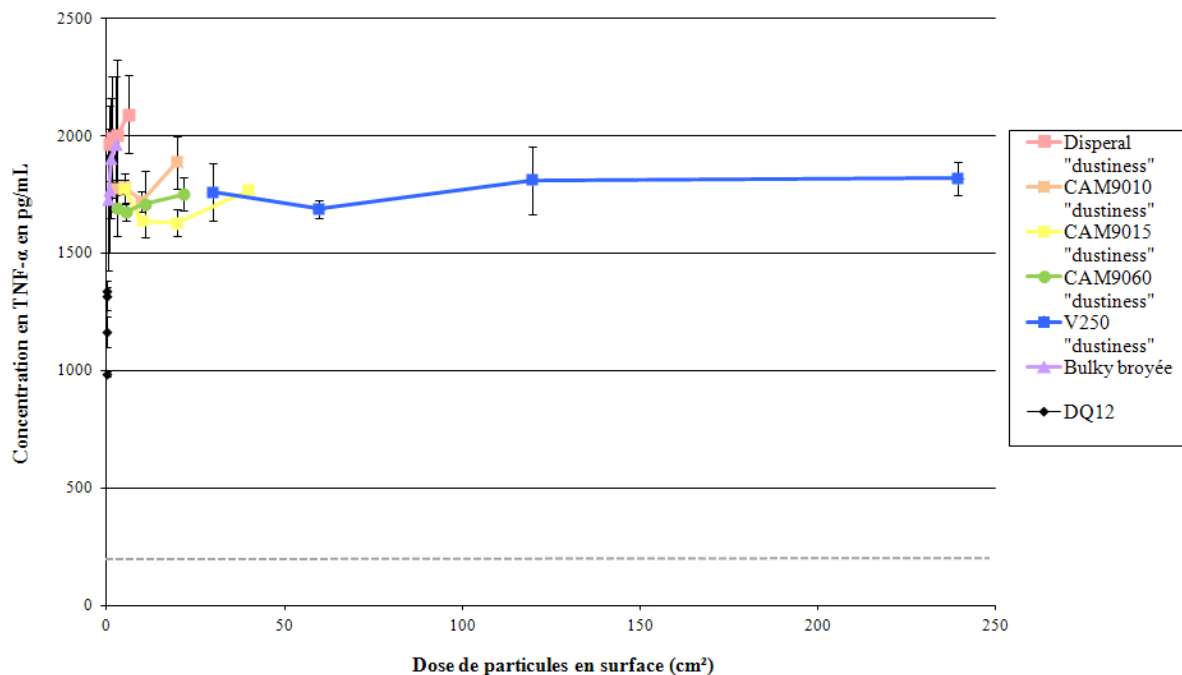
**Figure 153 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**

# ANNEXE B. EVALUATION BIOLOGIQUE DES PARTICULES DE BOEHMITE « NANOS » EN FONCTION DE LA DOSE EN SURFACE

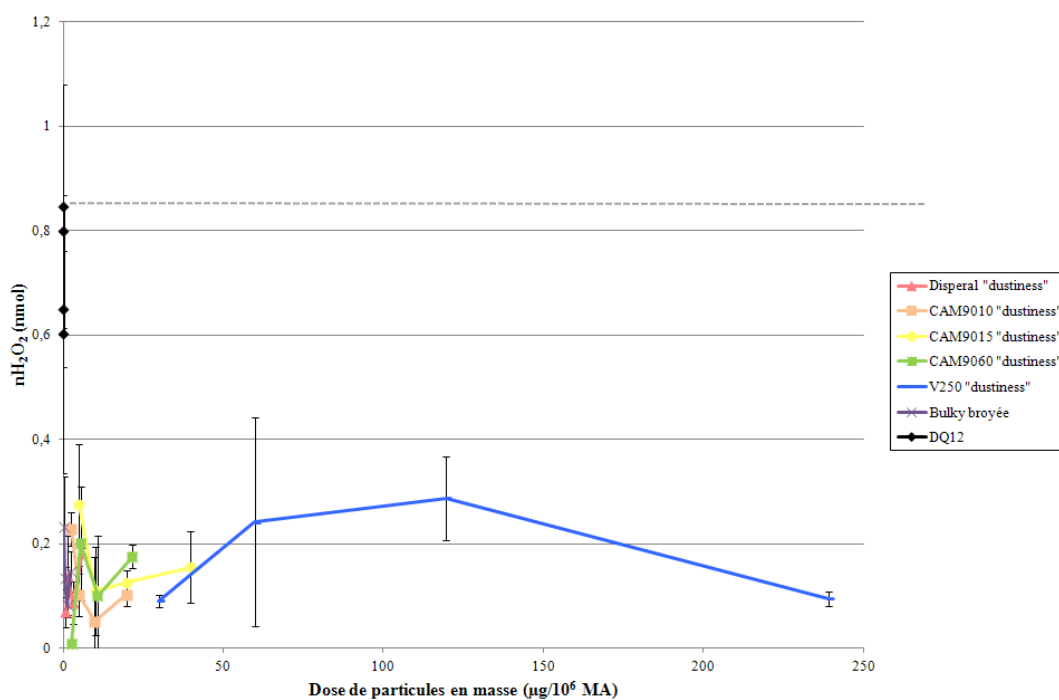
L'ensemble des différents paramètres évalués pour la toxicité biologique des poudres nanos est représenté sur les graphiques suivants et exprimés en fonction de la dose en surface de particules.



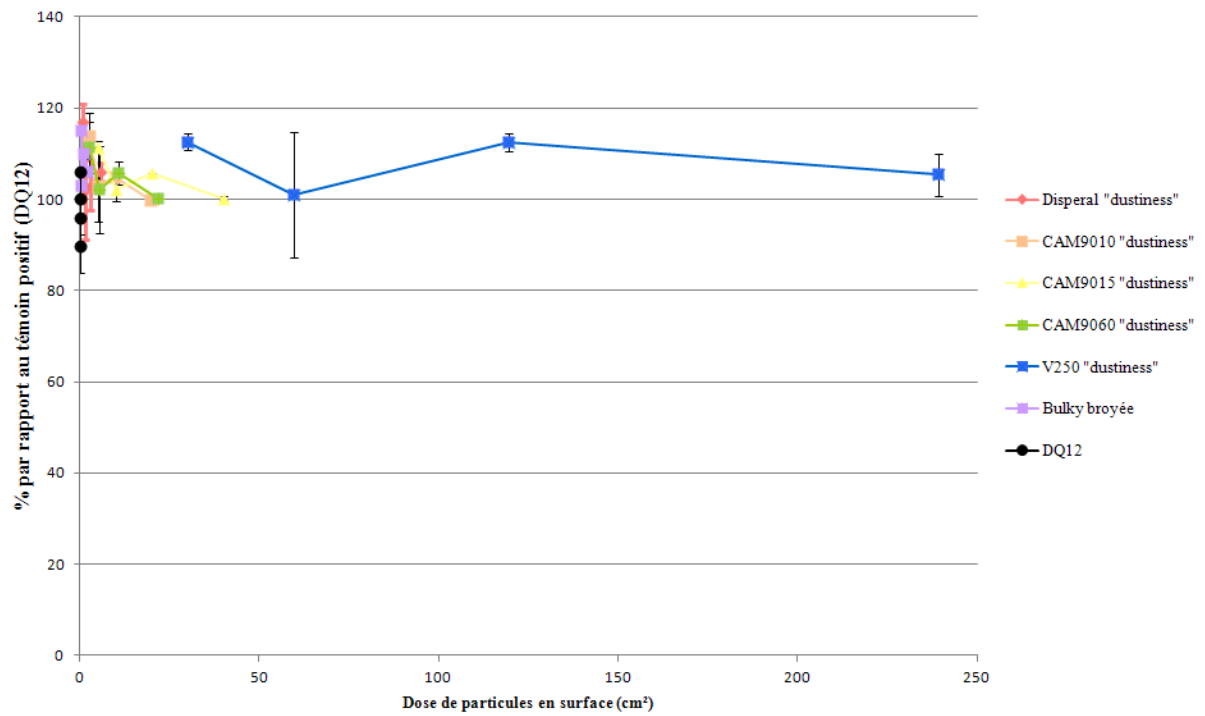
**Figure 154: LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**



**Figure 155 :** Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite « nanométriques » après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)



**Figure 156 :** Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules « nanométriques » après 90min de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)



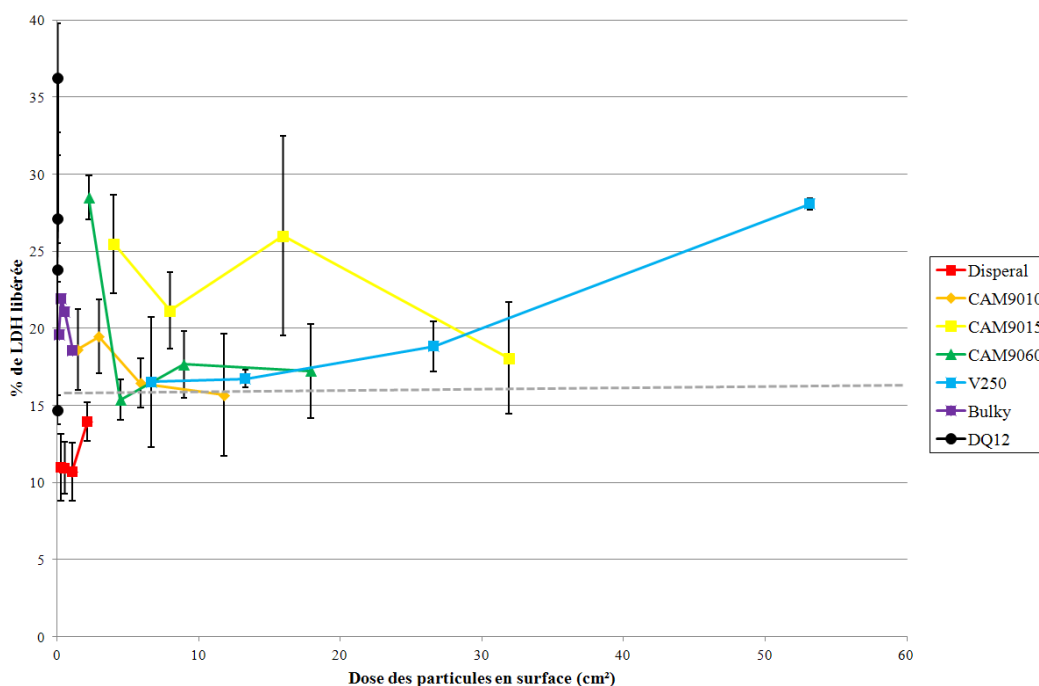
**Figure 157 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**

# ANNEXE C. EVALUATION

## BIOLOGIQUE DES PARTICULES EN FONCTION DE LA DOSE EN SURFACE

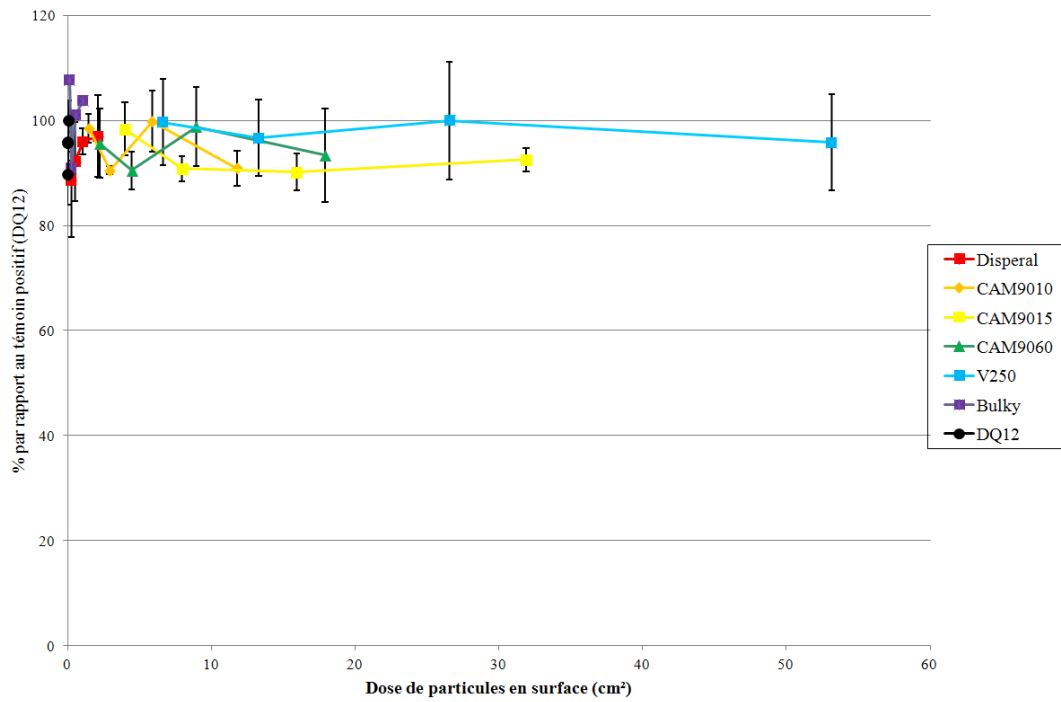
### C.1. Particules industrielles

#### C.1.1. Perte d'intégrité membranaire



*Figure 158: LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)*

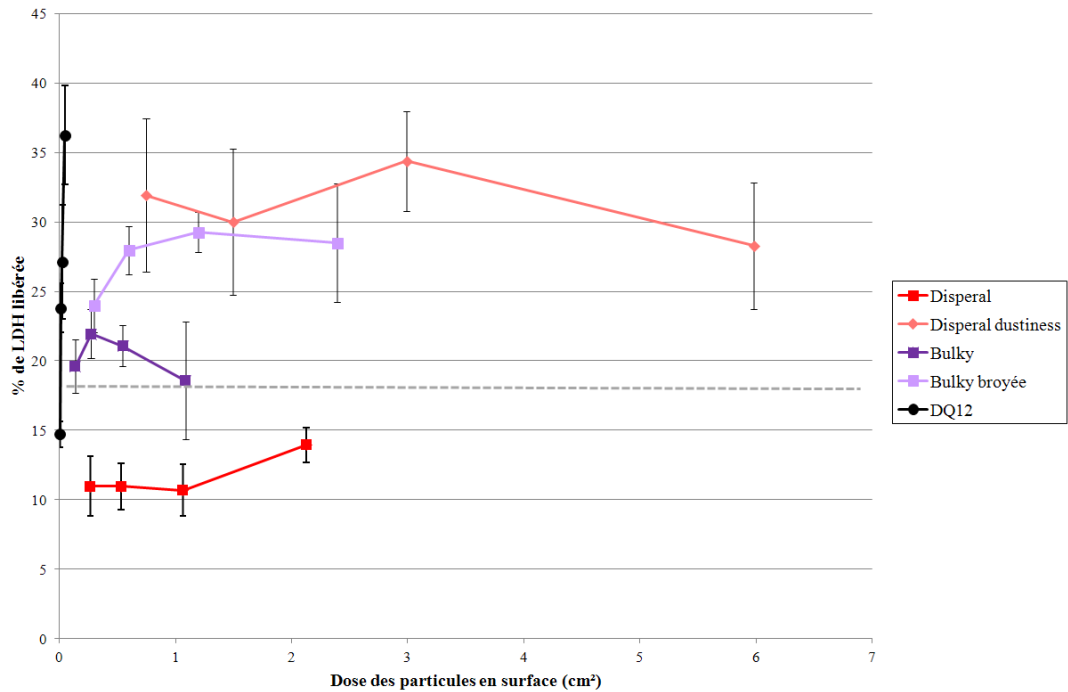
### C.1.2. Stress oxydant (TOX)



**Figure 159 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**

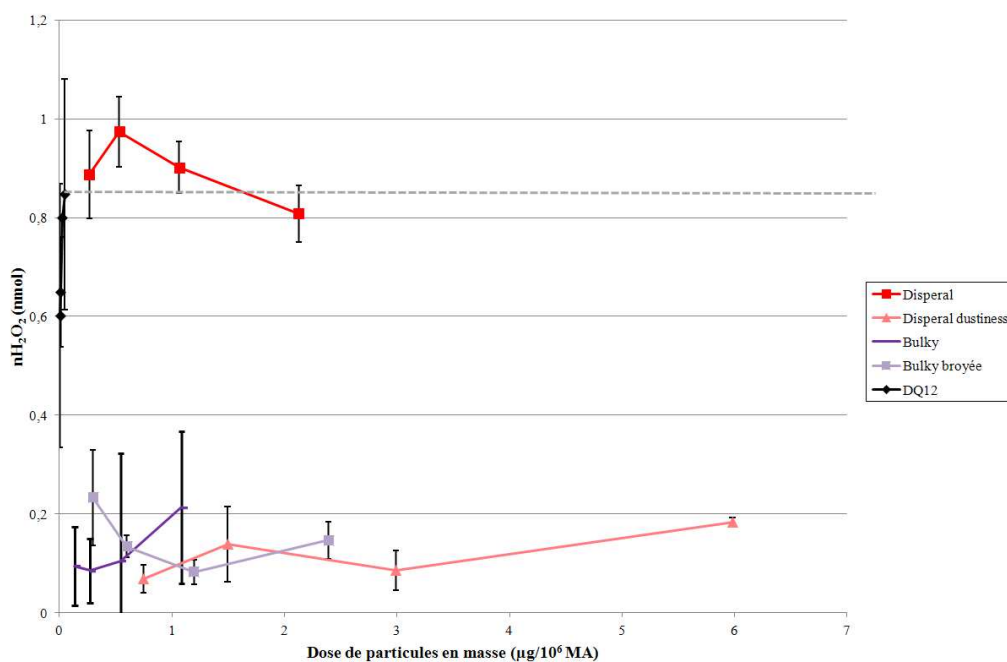
## C.2. Particules industrielles traitées

### C.2.1. Perte d'intégrité membranaire

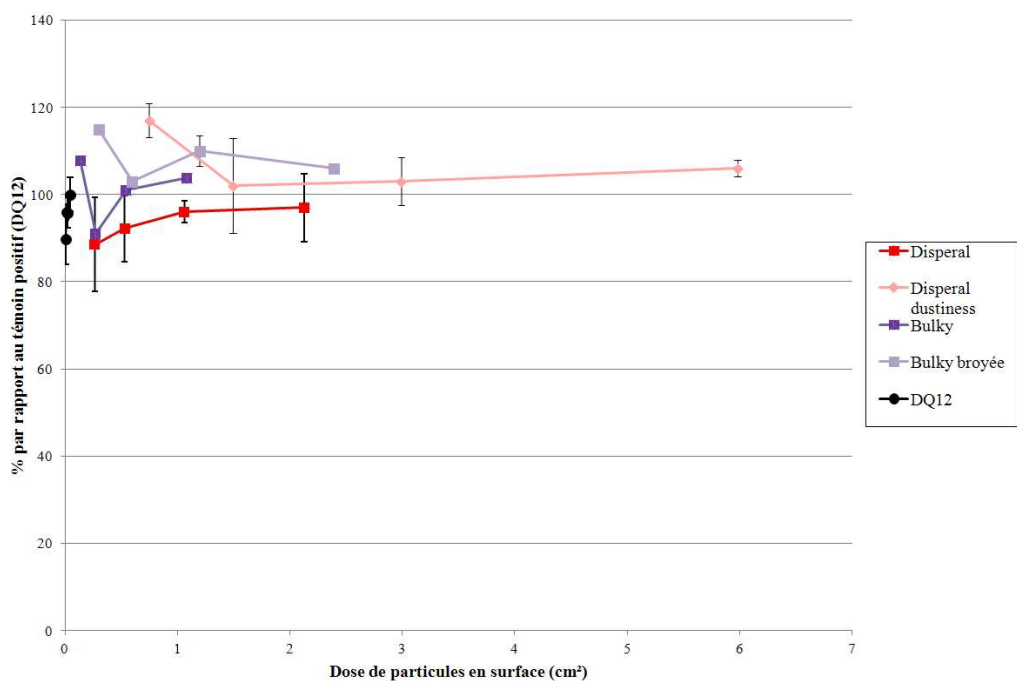


*Figure 160 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)*

### C.2.2. Stress oxydant



**Figure 161 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de  $H_2O_2$  en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**

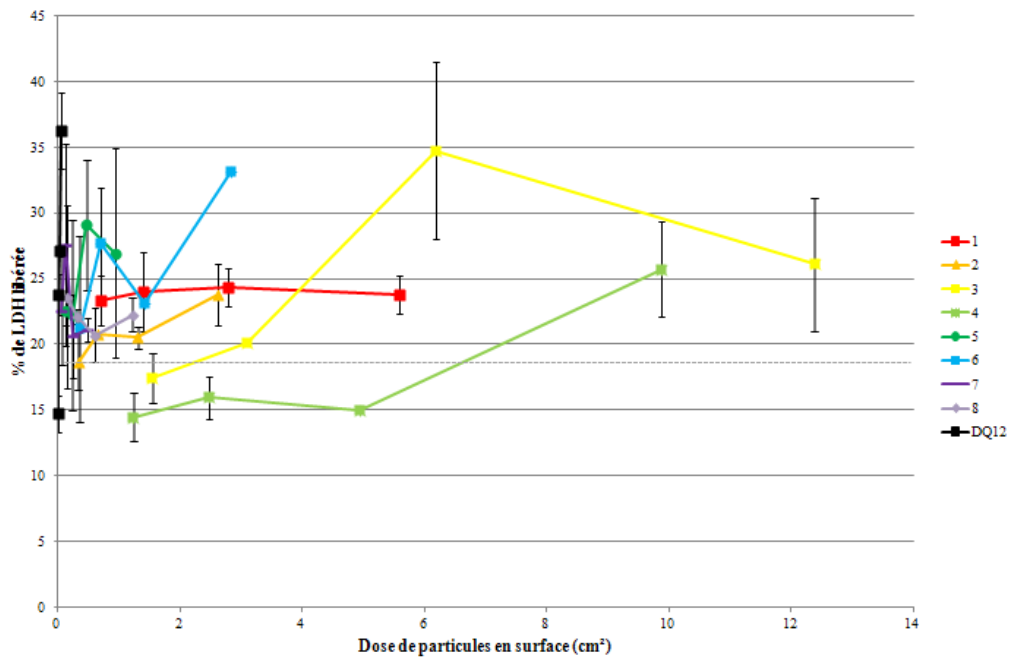


**Figure 162 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**



### C.3. Poudres de synthèse avant dispersion

#### C.3.1. Perte d'intégrité membranaire



*Figure 163 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)*

### C.3.2. Etat d'inflammation

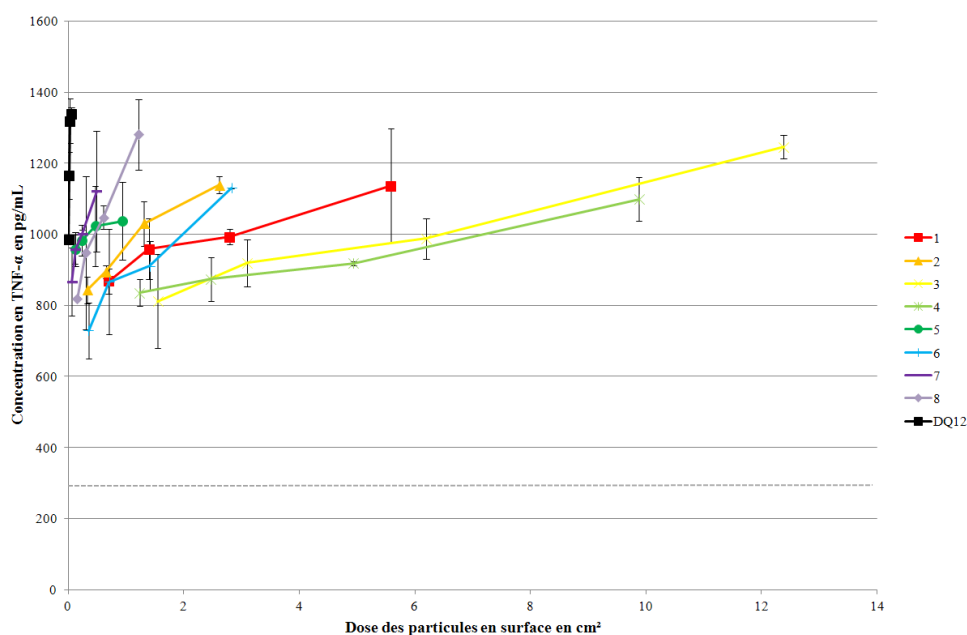


Figure 164 : Concentration de  $TNF-\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ )

### C.3.3. Stress oxydant

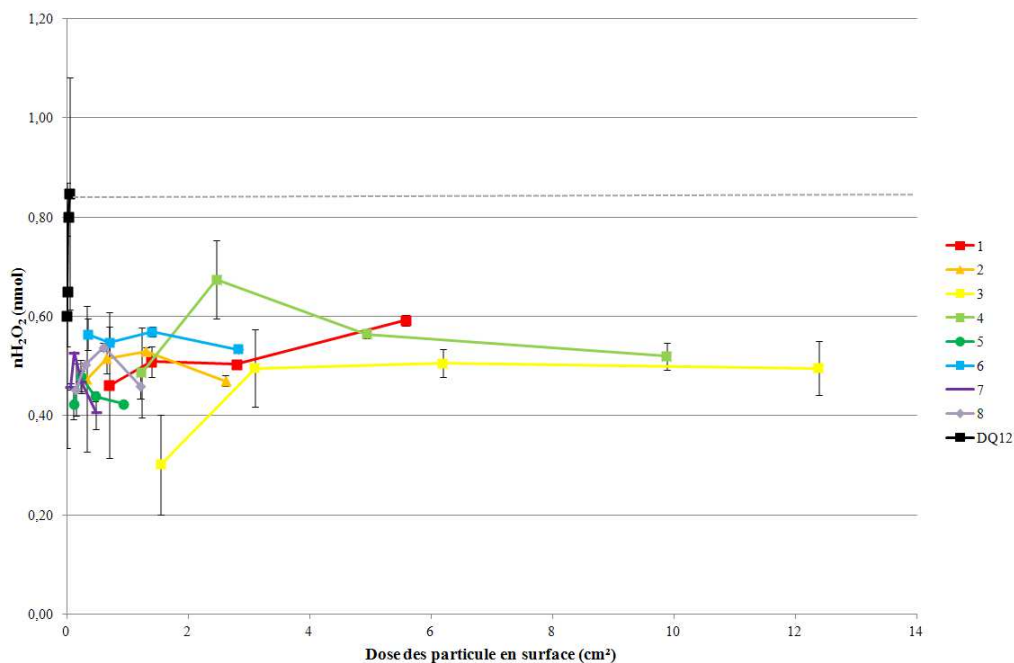
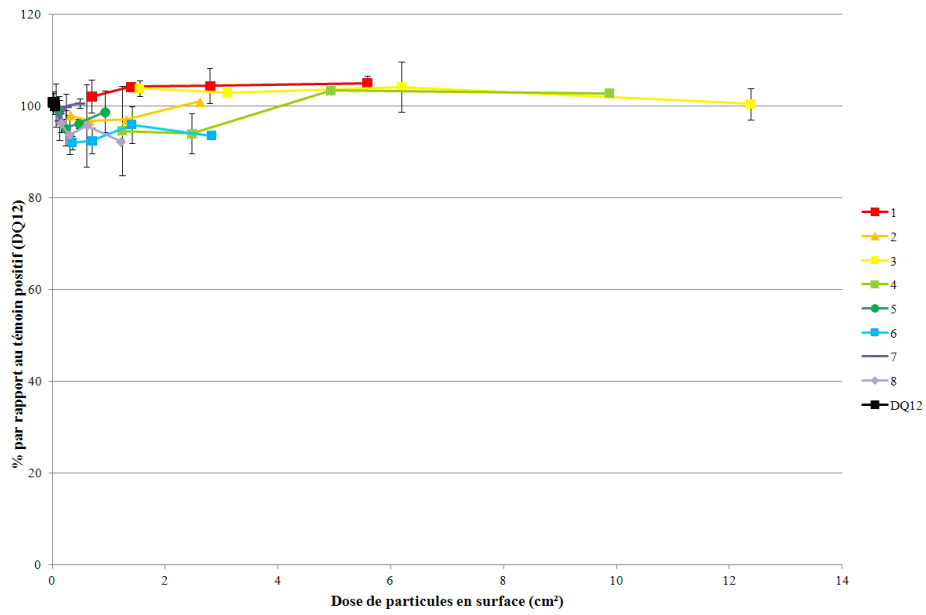


Figure 165 : Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de  $H_2O_2$  en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages ( $n=3$ )



**Figure 166 : Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)**

## C.4. Particules de synthèse après dispersion

### C.4.1. Perte d'intégrité membranaire

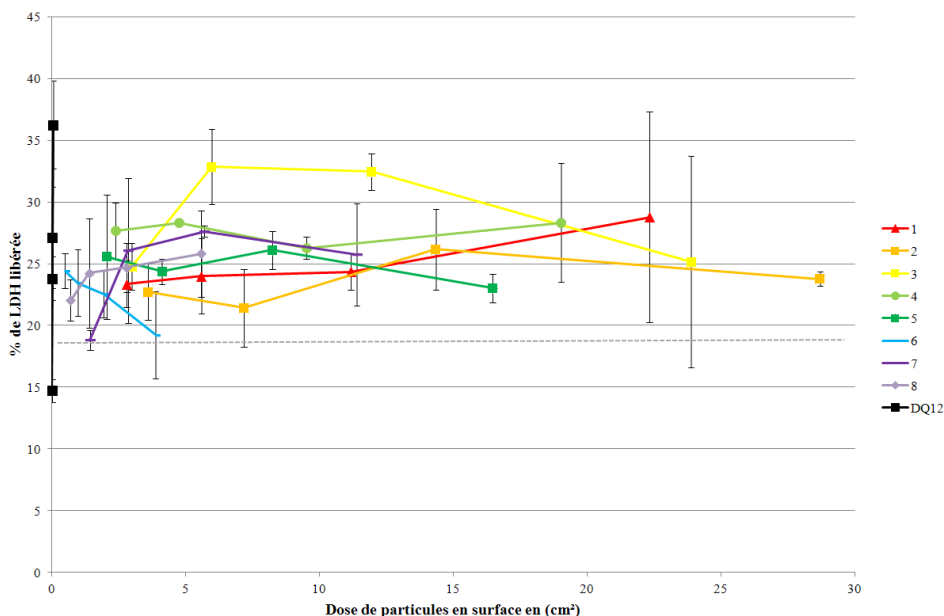


Figure 167 : LDH libérée en pourcentage par rapport aux cellules lysées en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)

### C.4.2. Etat d'inflammation

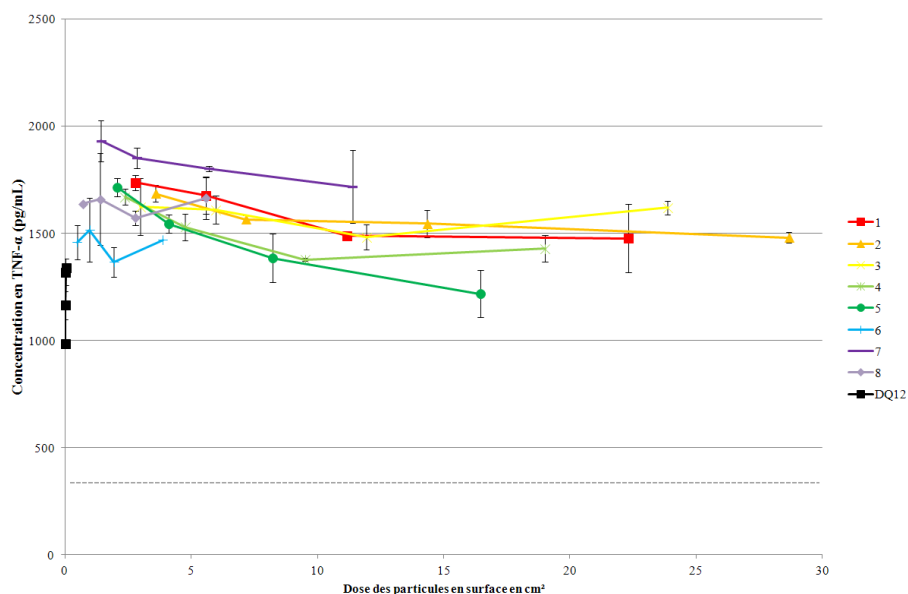
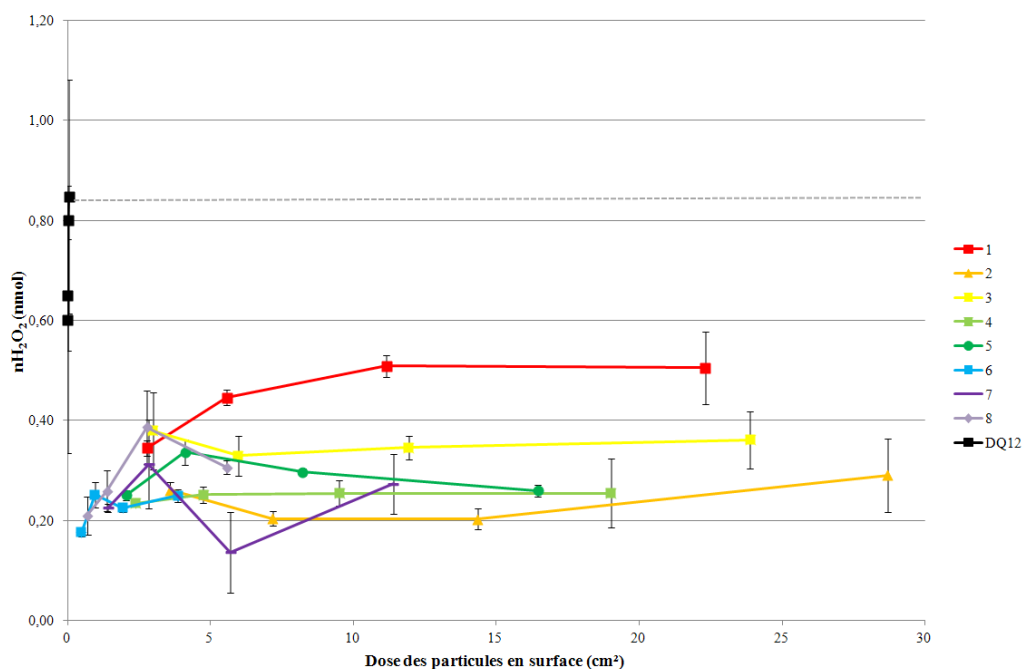
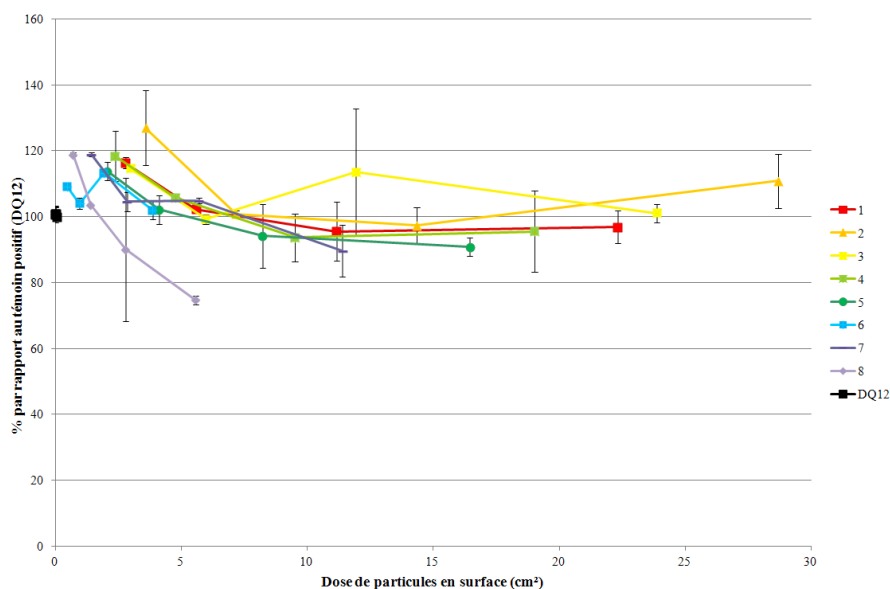


Figure 168 : Concentration de TNF-α en pg/mL en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)

### C.4.3. Stress oxydant

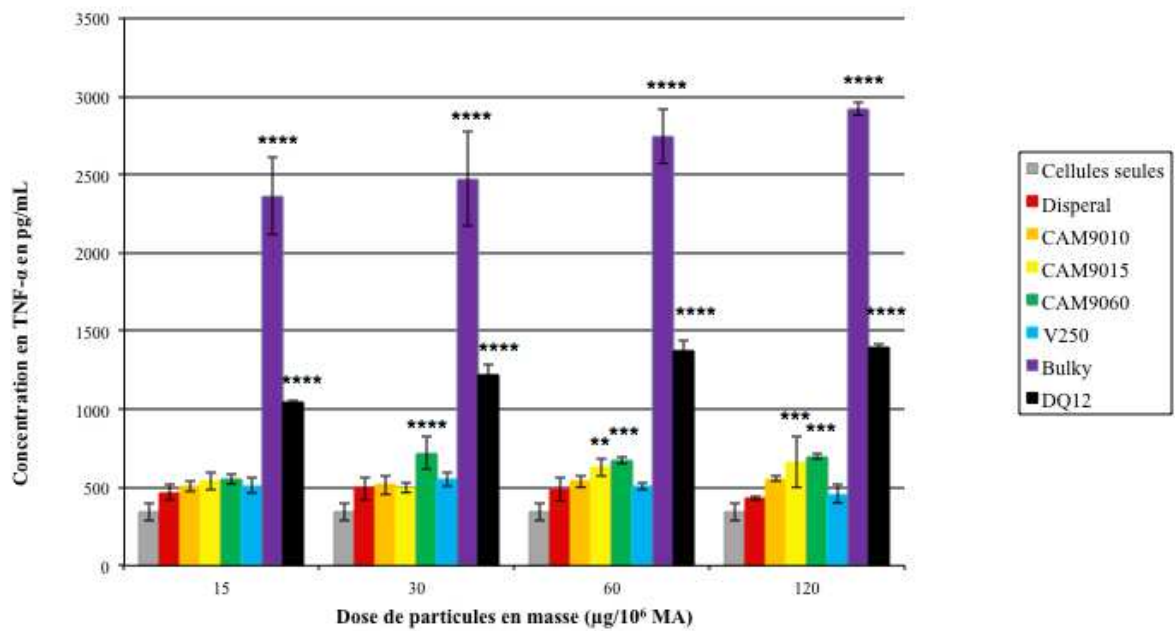


**Figure 169 :** Stress oxydant aigu (ROS) en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 90min de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)

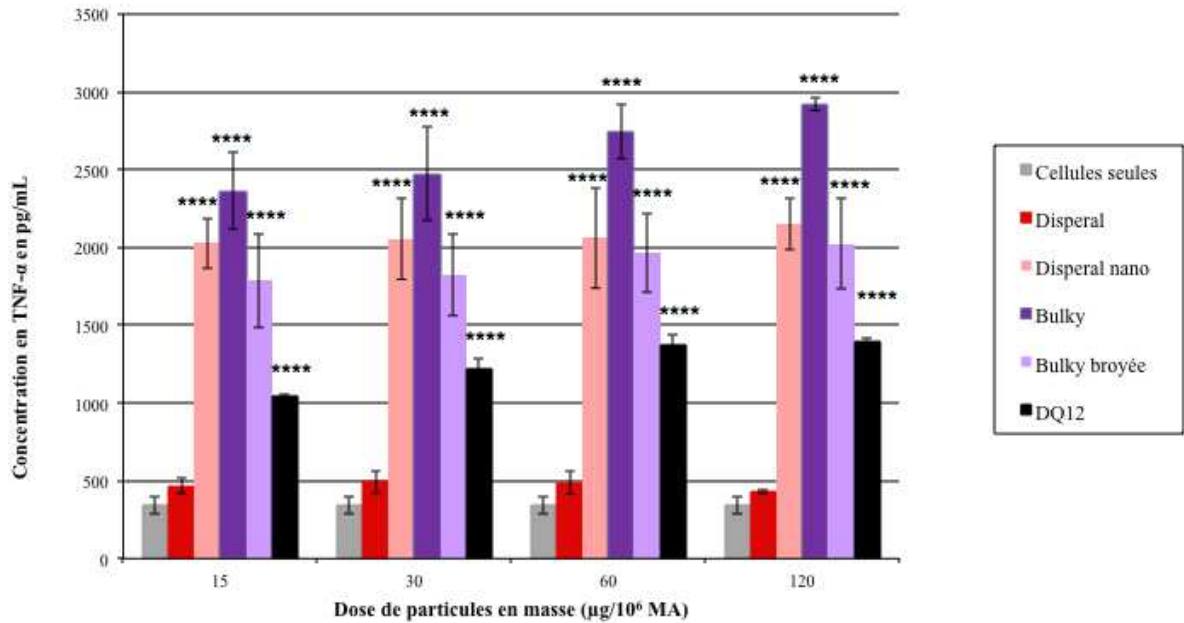


**Figure 170 :** Stress oxydant chronique (TOX) en pourcentage par rapport au témoin positif en fonction de la dose exprimée en surface pour les particules de boehmite synthétisées après dispersion (1min à 300W) après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (n=3)

# ANNEXE D. ETAT D'INFLAMMATION APRÈS CORRECTION



*Figure 171 : Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes après 24h de contact in vitro avec les macrophages de la lignée RAW 264.7 après correction, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA, n=3, \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05, toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))*



**Figure 172 :** Concentration de TNF- $\alpha$  en pg/mL en fonction de la dose exprimée en masse pour les particules brutes comparées aux particules « nanométriques » après 24h de contact *in vitro* avec les macrophages de la lignée RAW 264.7 après correction, à raison de différentes doses pour 1 million de macrophages (ELISA,  $n=3$ , \*\*\*\* $P<0,0001$ , \*\*\* $P<0,001$ , \*\* $P<0,01$ , \* $P<0,05$ , toutes les particules sont comparées par rapport au témoin négatif de toxicité (cellules seules))

# ANNEXE E. BIBLIOMÉTRIE PERSONNELLE

ACL : Articles dans des revues internationales ou nationales avec comité de lecture répertoriées par l'AERES ou dans les bases de données internationales

Total : 1

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

New insight into artifactual phenomena during *in vitro* toxicity assessment of engineered nanoparticles: study of TNF- $\alpha$  adsorption on alumina oxide nanoparticle

*En cours de révision*

**ACTI : Communications avec actes dans un congrès international**

**Total : 1**

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Study of the toxicity of inhaled ultrafine-engineered powder

Nanosafe 2010, Grenoble, 16 au 18 novembre 2010

Volume 304 of IOP Publishing's open access Journal of Physics: Conference Series

M Pailleux et al 2011 *J. Phys.: Conf. Ser.***304** 012041 doi: 10.1088/1742-6596/304/1/012041)



## **ACTN : Communications avec actes dans un congrès national**

Total : 6

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Évaluation de la toxicité de nanoparticules de boehmite: impact des propriétés physico-chimiques et des artéfacts d'adsorption sur la mesure des réponses biologiques

PMF2011, Saint Etienne, 25 au 27 mai 2011

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Évaluation de la toxicité de nanoparticules d'aluminium: impact des propriétés physico-chimiques et des artéfacts d'adsorption sur la mesure des réponses biologiques

Matériaux 2010, Nantes, 18 au 22 octobre 2010

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Etude de l'activité biologique des poudres de carbure de silicium après traitement oxydant

Colloque Sciences et Technologie des Poudres et Matériaux Frittés, Montpellier, du 27 au 29 mai 2009

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Study of the toxicity of ultrafine-engineered powder: example of boehmite nanoparticles

Poster : 6° Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA, Espace tête d'Or Villeurbanne, 28-29 mars 2011. Bulletin du Cancer, Volume 98, supplément 1 mars 2011

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Toxicity assessment of nanoparticles: impact of physico-chemical properties and adsorption artifacts on biological responses

Poster : 5° Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA, Espace tête d'Or Villeurbanne, 30-31 mars 2010. Bulletin du Cancer, Volume 97, numéro spécial mars 2010

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Toxicity assessment of nanoparticles: impact of physico-chemical properties and adsorption artifacts on biological responses

Poster : 4èmes Journées Scientifiques du CLARA, Archamps, 24 au 25 mars 2009. Bulletin du Cancer, Volume 96, numéro spécial mars 2009

**AFF : Communications par affiche dans un congrès international ou national**

Total :13

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Toxicity assessment of boehmite nanoparticles: adsorption artifacts on biological responses on TNF- $\alpha$  biomolecule *in vitro* production.

International Conference of Bio-Nano-Responses, Essen, 11 au 15 Septembre 2011

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Toxicity assessment of boehmite nanoparticles: adsorption artifacts on biological responses on TNF- $\alpha$  biomolecule *in vitro* production.

Journée de la recherche de l'EDSIS (Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé), Saint Etienne, 19 mai 2011

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Toxicity assessment of boehmite nanoparticles: adsorption artifacts on biological responses on TNF- $\alpha$  biomolecule *in vitro* production.

Journées du Clara, Lyon, 28 et 29 mars 2011

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Study of the toxicity of inhaled ultrafine-engineered powder

Journée de l'IFRESIS, Saint Etienne, 24 novembre 2010

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Study of the toxicity of inhaled ultrafine-engineered powder

11ème colloque Rhône-Alpes de quantimétrie cellulaire, Saint Etienne, 16 au 17 juin 2010

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Study of the toxicity of inhaled ultrafine-engineered powder

Nanotoxicology 2010, Edinburgh, 2 au 4 juin 2010

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Etude de la toxicité de nanoparticules de boehmite inhalées

Journée de la recherche, Saint Etienne, 6 mai 2010

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Etude de la toxicité de nanoparticules de boehmite inhalées

5° Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA, Espace tête d'Or Villeurbanne, 30-31 mars 2010

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Etude de la toxicité de nanoparticules de boehmite inhalées

Journées du GFC 2010, Saint Etienne, 23 au 25 mars 2010

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Etude de la toxicité par inhalation de poudres industrielles ultrafines

SFGP 2009 (XII° Congrès de la Société Française de Génie des Procédés Pour relever les défis industriels du XXI° siècle A la croisée des Sciences et des Cultures), Marseille, 14 au 16 octobre 2009

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Etude de l'activité biologique des poudres de carbure de silicium après traitement oxydant

« Prix du jeune chercheur »

Colloque Sciences et Technologie des Poudres et Matériaux Frittés, Montpellier, du 27 au 29 mai 2009

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Etude de l'activité biologique des poudres de carbure de silicium après traitement oxydant  
4èmes Journées Scientifiques du CLARA, Archamps, 24 au 25 mars 2009

**PAILLEUX M., POURCHEZ J., BOUDARD D., GROSSEAU P., COTTIER M.**

Etude de l'activité biologique des poudres de carbure de silicium après traitement oxydant  
Journée scientifique IFRESIS, Saint Etienne, 18 décembre 2008

# ANNEXE F. ARTICLE EN COURS DE RÉVISION

**New insight into artifactual phenomena during *in vitro* toxicity assessment of engineered nanoparticles: study of TNF- $\alpha$  adsorption on alumina oxide nanoparticle**

**Mélanie Pailleux<sup>a,b</sup>, Delphine Boudard<sup>a,c,d,e</sup>, Jérémie Pourchez<sup>a,f</sup>, Philippe Grosseau<sup>b</sup>, Michèle Cottier<sup>a,c,d,e</sup>**

<sup>a</sup>LINA, EA 4624, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>b</sup>Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, SPIN-EMSE, CNRS :FRE3312, LPMG, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>c</sup>Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>d</sup>Université Jean Monnet, Faculté de Médecine, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>e</sup>CHU de Saint-Etienne, F-42055, Saint-Etienne, France

<sup>f</sup>Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, CIS-EMSE, LINA EA4624, F-42023, Saint-Etienne, France

*Running headline:* Adsorption/degradation artifacts in toxicity study

*Complete contact information:*

Mélanie PAILLEUX

Centre SPIN

LPMG FRE 3312

École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

158, Cours Fauriel - 42023 Saint-Etienne Cedex 2, FRANCE

E-mail : [pailleux@emse.fr](mailto:pailleux@emse.fr)

Tel: (+33) 4 77 49 97 08 Fax: (+33) 4 77 49 96 94

## ABSTRACT

Biomolecules can be adsorbed on nanoparticles (NP) and degraded during *in vitro* toxicity assays. These artifactual phenomena could lead to misinterpretation of biological activity, such as false-negative results. To avoid possible underestimation of cytokine release after contact between NP and cells, we propose a methodology to account for these artifactual phenomena and to lead to accurate measurements. We focused on the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . We studied a well-characterized boehmite engineered NP [aluminum oxide hydroxide, AlO(OH)]. The rate of TNF- $\alpha$  degradation and its adsorption (on boehmite and on the well walls) were determined in cell-free conditions by adding a known TNF- $\alpha$  concentration (1500 pg/ml) under various experimental conditions. After a 24-h incubation, we quantified that 7 wt% of the initial TNF- $\alpha$  degraded over time, 6 wt% was adsorbed on the well walls in the 96-well plates, and 13 wt% was adsorbed on the boehmite surface. Finally, boehmite NP were incubated with murine macrophages (RAW 264.7 cell line). The release of TNF- $\alpha$  was assessed for boehmite NP and the experimental data were corrected considering the artifactual phenomena, which accounted for about 20%–30% of the total.

*Keywords:* boehmite nanoparticles; toxicity; TNF- $\alpha$  adsorption; TNF- $\alpha$  degradation; correction curve

## Introduction

The importance of manufactured nanoparticles (NP) has steadily increased for 20 years. In 2015, the share of nanotechnology in the global economy will be about 1000 billion dollars (National Science Foundation, 2003). NP have applications in various fields such as automotive and multimedia industries (Chen et al., 2004; Murphy et al., 2005) and in cosmetics (Nohynek et al. 2007; Somasundaran and Krishnakumar, 1997) as well as in medicine. However, they may have effects on human health by inducing inflammation or oxidative stress. In particular, boehmite NP [aluminum oxide hydroxide,  $\text{AlO}(\text{OH})$ ] are used in a wide range of industrial applications and in many commercial products such as abrasive materials, catalysts, substrates for electronic circuits, and refractory materials; additionally, they are used as vectors in vaccines, replacing conventional adjuvants (Singh et al., 2007). Therefore, due to high potential exposures to boehmite NP, particularly in workplace environments, this type of nanomaterial represents an interesting model for biological activity assessments.

Although some toxicological evaluations have already been carried out, the potential impact on health of boehmite is not yet completely characterized. It has been shown during *in vitro* experiments using RAW 264.7 (murine monocyte/macrophage-like) and A549 (human lung cancer) cell lines that boehmite can induce inflammation (interleukin [IL]-8 production) and cytotoxicity (lactate dehydrogenase [LDH] release) (Kuhlbusch et al., 2009). As a result, boehmite could be considered to carry a potential health risk.

Recent papers clearly show that physicochemical properties should be taken into account in nanotoxicological studies (Boczkowski et al., 2010). Especially for *in vitro* assays, the possible interference of NP with the medium compounds (assay reagents) and within detection systems (Geys et al., 2010; Horie et al., 2009; Kroll et al., 2009; Monteiro-Riviere et al., 2009) and the role of serum addition on dispersion and adsorption at the particle surface



(Murdock et al., 2008) should be carefully considered. Moreover, some studies also suggest possible biases in the evaluation of the biological toxicity, particularly when the release of cytokines is assessed (Val, 2009). Indeed, the cytokines can be adsorbed on the surface of the NP, resulting in an underestimation of the quantity released (Akhtar et al., 2010; Cedervall et al., 2007; Val, 2009).

Cedervall et al. (2007) introduced an approach that identifies proteins on NP (*N*-isopropylacrylamide-*co-N*-*tert*-butylacrylamide) and the exchange with plasma proteins (human serum albumin). Val (2009) measured the capacity of titanium dioxide and carbon black NP to adsorb different pro-inflammatory cytokines, including IL-6, granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF), and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . Using different types of particulate matter and placing them in contact with standard IL-8 in a cell-free system, Akhtar et al. (2010) showed that particles exhibited differential IL-8 adsorption capacities depending on their physicochemical properties. These results tend to lead to the same conclusions: protein or cytokine adsorption on NP depends on NP surface characteristics and size; furthermore, the nature of the biomolecules adsorbed on the NP will affect the biological toxicity.

Additionally, Turci et al. (2010) used a new set of complementary techniques to characterize and compare the adsorption of different proteins on silica NP. The proteins studied were bovine serum albumin, hen egg lysozyme, bovine pancreatic ribonuclease A, and bovine lactoperoxidase. Although adsorption was influenced by the net protein charge, the surface charge distribution of proteins determined the affinity for the solid support (silica NP) and the stability of adsorption of proteins on silica NP.

Finally, Xia et al. (2010), using predictive models, described the kinetics of the protein corona formation. Xia et al. (2010) used a biological surface adsorption index (BSAI) to characterize the adsorption properties of NP by quantifying the competitive adsorption of a set

of small molecule probes onto NP by mimicking the molecular interactions of the NP with proteins. By these means, the molecular interactions of NP with proteins could be characterized by the BSAI nanodescriptors, which govern the adsorption affinity and selectivity of biomolecules onto the surfaces of nanomaterials in the corona-formation processes. These results were used to determine if the findings obtained for biological activity were correct or if they represented a false-negative result due to an artifact such as adsorption on NP.

The objectives of the present study were to highlight artifacts that could occur during *in vitro* toxicity assessments, especially in TNF- $\alpha$  measurement, and to propose a methodology to quantify them in order to correct a possible underestimation of the TNF- $\alpha$  released. Boehmite NP were incubated either in cell-free conditions or with a murine macrophage cell line (RAW 264.7). The experiments were conducted at two temperatures (4 °C and 37 °C), with two types of support (glass flask or polystyrene 96-well plates). We demonstrated that in addition to adsorption, TNF- $\alpha$  degradation also occurred. We finally proposed a correction applicable to boehmite, taking into account these two types of artifactual phenomena. The methodology for establishing the correction is easily transposable to other kinds of NP and biomolecules.

## Material and Methods

### *Physicochemical characterization of NP*

The powder morphologies of NP were analyzed using electron microscopy in the SEM mode with a field-emission scanning electron microscope (JEOL JSM-6500F) or in the TEM mode with « X » transmission electron microscope.

The specific surface areas were determined by N<sub>2</sub> adsorption at 77 K after out-gassing for 2 h at 200 °C (Micromeritics ASAP 2000), using the Brunauer-Emmet-Teller (BET) method.

NP densities were determined using a gas pycnometer (Micromeritics AccuPyc 1330) working under a helium atmosphere. Results are expressed as the means of 10 successive measurements on the same sample. For the zeta potential and size measurement, the boehmite suspension was fixed at 100 mg/L and prepared both in water and in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Analyses were performed using a diffusion light scattering (DLS) device (ZetaSizer nano S, Malvern Instrument). X-ray diffraction (Siemens D5000 apparatus) experiments were performed at room temperature to examine the presence of crystalline phases. The crystallite size was calculated from the diffractograms obtained using the Scherrer relation (Topaz-4P software).

### *In vitro assays*

#### Cell line and culture conditions

The RAW 264.7 macrophage-like cell line, derived from mice, was provided by the ATCC Cell Biology Collection (Promochem LGC). Cells were cultured in DMEM (Gibco) complemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 1% penicillin-streptomycin (penicillin

10,000 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, Sigma) and incubated at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere (Leclerc et al. 2010).

Boehmite (AlOOH) NP were resuspended in complete DMEM (DMEMc), vortexed for 30 s and then different concentrations were incubated with cells: 150, 300, 600, and 1200 µg/ml. Suspensions were freshly prepared just before experiments and discarded after each test series without any storage. We checked the hydrodynamic size of boehmite particles by DLS.

For each experiment, cells were prepared in 96-well plates (100,000 cells/well) in 25 µl of DMEMc. Seventy-five microliters of each boehmite suspension was added to the culture and then incubated for 24 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

#### Pro-inflammatory TNF- $\alpha$ response

Three independent experiments were performed using four different boehmite NP concentrations (150, 300, 600, and 1200 µg/ml) and were tested for each of the following conditions: cells alone (negative control of toxicity), DQ 12 quartz (positive control of toxicity) (Bruch et al. 2004), and boehmite NP.

After a 24-h incubation with NP, the release of TNF- $\alpha$  was assessed in the culture supernatant using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Quantikine® Mouse TNF- $\alpha$  Immunoassay, R&D Systems). The optical density of each well was determined according to the manufacturer's instructions by using a microplate reader (Multiskan RC, Thermolabsystems) set to 450 nm. A standard curve was established and results were expressed in picograms of TNF- $\alpha$  per milliliter of supernatant.

#### LDH release

The activity of the LDH released from cells with damaged membranes was assessed using the CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Detection was performed on a fluorometer (Fluoroskan Ascent, ThermoFisher), using 530/590 nm excitation/emission wavelengths. The activity of the released LDH was reported in comparison to total cellular LDH (measured after control cell lysis) and was expressed as a percentage of the control.

### *Assessment of artifactual phenomena*

#### TNF- $\alpha$ degradation

The TNF- $\alpha$  standard solution used for the assessment of adsorption and degradation phenomena was provided by the ELISA kit (Quantikine® Mouse TNF- $\alpha$  Immunoassay, R&D Systems). The assays were performed in a cell-free environment. Since adsorption and degradation always occur simultaneously, our strategy was to work with a huge volume to surface ratio in order to mainly observe the degradation phenomenon compared with the adsorption phenomenon. In this frame, the experiments in glass flasks limit the adsorption phenomenon as much as possible compared with experiments in 96-wells plates.

A defined amount of TNF- $\alpha$  (1500 pg/ml) was suspended in DMEMc (without NP, in cell-free environment) in a glass flask at different temperatures: 4 °C (refrigerator) and 37 °C (incubator) for different times (3, 16, 24, and 48 h). The 4 °C temperature corresponded to the TNF- $\alpha$  storage condition (to avoid any degradation phenomenon) and 37 °C corresponded to the *in vitro* experimental conditions. The difference between the results at 4 °C and 37 °C permitted determining the quantity of degraded TNF- $\alpha$ .

#### TNF- $\alpha$ adsorption on the support walls

A concentration of TNF- $\alpha$  (1500 pg/ml) was added to DMEMc in 96-well plates, at 4 °C and 37 °C for different durations (3, 16, 24, and 48 h). The difference between the results in glass and in plastic allowed determining the quantity of adsorbed TNF- $\alpha$  on the walls of wells.

#### TNF- $\alpha$ adsorption on boehmite

A concentration of TNF- $\alpha$  (1500 pg/ml, representing 75 pg of TNF- $\alpha$  per well) was introduced with boehmite (1200  $\mu$ g, representing 12  $\mu$ g of NP per well) in DMEMc in 96-well culture plates. After a 24-h contact, supernatants were collected, and the concentration of TNF- $\alpha$  was evaluated as previously described. The mass variation of TNF- $\alpha$  was then calculated.

#### Adsorption isotherms of TNF- $\alpha$

Different TNF- $\alpha$ /boehmite weight ratios were established (0.78, 1.56, 3.13, and 6.25) by adding varying amounts of TNF- $\alpha$  to cell cultures. Contact was for 1, 3, 16, and 24 h at 37 °C in DMEMc in 96-well culture plates to determine the kinetics of TNF- $\alpha$  adsorption on boehmite. For each condition, the residual TNF- $\alpha$  was measured using the same ELISA procedure as previously described. For each ratio, the mass of adsorbed TNF- $\alpha$  was determined with regard to the duration of contact. It was estimated as the difference between the residual and initial concentrations of TNF- $\alpha$  in the supernatant, taking care to subtract degraded TNF- $\alpha$  as previously determined. When the adsorbed TNF- $\alpha$  reached a maximal level, the curve describing the mass of adsorbed TNF- $\alpha$ , depending on the mass of residual TNF- $\alpha$ , could be drawn. It represented the isotherm curve at the thermodynamic equilibrium,

and it allowed correction of the results for the amount of TNF- $\alpha$  degraded and adsorbed on well walls and NP.

### *Statistical analysis*

Analysis and graphics were performed on Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Significance was established with ANOVA test ( $p < 0.05$ ).

## Results

### *Physicochemical characterization of boehmite NP*

#### Specific surface area, density, electron microscopy, and X-ray diffraction

Boehmite is made of spherical particles. Although some particles exhibit a diameter of about 50  $\mu\text{m}$ , the major part is much smaller (from 1 to 10  $\mu\text{m}$  in diameter). Small elements like platelets of around 20 nm can be observed by SEM (Figure 1).

The specific surface area,  $S_{\text{BET}}$ , was measured as 157  $\text{m}^2/\text{g}$ . The density,  $\rho_{\text{pp}}$ , was determined to be 3.28  $\text{g}/\text{cm}^3$  by using the helium pycnometer. Using these data and Equation 1, we determined a primary particle diameter ( $d_{\text{pp}}$ ) of 11.7 nm, assuming a spherical shape of boehmite nanoparticles as confirmed by electron microscopy observation (Figure 1).

$$d_{\text{pp}} = \frac{6}{\rho_{\text{pp}} \times S_{\text{BET}}} \quad d_{\text{pp}} = \frac{6}{\rho_{\text{pp}} * S_{\text{BET}}} [1]$$

where  $d_{\text{pp}}$  is expressed in micrometers,  $\rho_{\text{pp}}$  in grams per cubic centimeters, and  $S_{\text{BET}}$  in squared meters per gram.

The observed position of X-ray diffraction peaks was in agreement with the data reported for boehmite crystalline phase (JCPDS n°21-1307). The broad diffraction lines revealed a crystallite size of  $10 \pm 0.1$  nm according to the Scherrer relation (Figure 2). This size accorded perfectly with electron microscopy data.

#### Particle size and zeta potential measurement

DLS assays (Figure 3) clearly showed that aggregation of the NP occurred in water and increased with pH. At pH 3.5, a narrow particle-size distribution was observed with a maximum at 50 nm; at pH 6.9 the maximum was located at 315 nm; and finally at pH 9.4, the



particle size was 770 nm. In DMEMc (pH 7.4) NP showed a broad particle-size distribution, with a maximum at 825 nm.

Thus, at a similar pH, boehmite NP are more aggregated in DMEMc than in water (825 nm and 315 nm, respectively).

Zeta potential measurement proved that NP have a positive surface charge until pH 9.5 (the isoelectric point); beyond this value, NP are negatively charged. This result explained the rise of agglomeration observed with pH. As a matter of fact, the more the pH was near the isoelectric point, the more the NP were agglomerated.

#### *In vitro toxicity assessment*

##### Pro-inflammatory TNF- $\alpha$ response

After 24-h contact between boehmite and macrophages (Figure 4A), the amount of TNF- $\alpha$  released by cells alone was quite negligible (50 pg/ml), moderate for boehmite (300 pg/ml), and high for the DQ 12 positive control (from 800 to 1000 pg/ml). In contrast to boehmite results, the DQ 12 quartz response was clearly dose dependent.

##### LDH release

Cells incubated for 24 h with boehmite NP released the same level of LDH as the negative control (cells tested alone, without NP) and no dose-dependent effect was observed (Figure 4B).

The positive control of toxicity (DQ12 quartz) exhibited a level of released LDH that was significantly higher and dose dependent (34% of released LDH for 1200  $\mu$ g/ml of boehmite).

### *Adsorption and degradation of TNF- $\alpha$ in cell-free conditions*

#### TNF- $\alpha$ degradation

The experiment in the glass flask at 4 °C clearly showed no significant adsorption and no degradation phenomena (Figure 5). For the same experimental conditions at 37 °C, we assumed that the observed mass change of TNF- $\alpha$  was due only to the degradation phenomenon ( $\Delta m$  TNF- $\alpha$  of 6.5 wt% after 24 h). Finally, the amount of TNF- $\alpha$  degraded in DMEMc was dependent on the duration of the experiment and the temperature, and we approximated the rate of TNF- $\alpha$  degradation at 0.12 pg/h at 37 °C in DMEMc.

#### TNF- $\alpha$ adsorption on the walls of the wells

After 24-h contact at 37 °C in DMEMc without boehmite, 11.6 wt% loss of TNF- $\alpha$  was observed in polystyrene wells. Under these conditions, both TNF- $\alpha$  degradation and adsorption on the walls of the well occurred. However, loss only reached 6.5 wt% in the glass flask in which only degradation occurred, given the very low surface to volume ratio of the flask. Thus, we demonstrated significant TNF- $\alpha$  adsorption on the walls of wells in which we did the assays. This adsorption was calculated by the difference between experiments in wells and in the glass flask.

#### TNF- $\alpha$ adsorption on boehmite

After 1-h contact, no significant difference in TNF- $\alpha$  mass loss ( $\Delta m$  TNF- $\alpha$ ) was observed between the assays with and without NP in polystyrene wells at 37 °C (about 7% of  $\Delta m$  TNF- $\alpha$  for both conditions, Figure 5). In contrast, we observed a significant increase in

$\Delta m$  TNF- $\alpha$  after a 24-h incubation due to the presence of boehmite (24.8 wt% after 1 h versus 11.6 wt% after 24 h). These results suggest that significant TNF- $\alpha$  adsorption on boehmite occurred. After 24 h we noticed a saturation of TNF- $\alpha$  adsorption on boehmite (indeed after 48 h the TNF- $\alpha$  mass loss was fixed at 25.2%).

#### Adsorption isotherms of TNF- $\alpha$

The kinetics curve of adsorption revealed that the amount of TNF- $\alpha$  adsorbed on the boehmite surface reached a thermodynamic equilibrium at 24 h, regardless of the boehmite to TNF- $\alpha$  weight ratio (Figure 6). Thus, the curve representing the adsorbed TNF- $\alpha$  based on the residual TNF- $\alpha$  could be drawn (i.e., the adsorption isotherm curve), after subtracting the amount of degraded TNF- $\alpha$ , which was calculated based on the previously determined TNF- $\alpha$  degradation rate of 0.12 pg/h.

Using the adsorption isotherm curve and knowing the amount of residual TNF- $\alpha$  in the supernatant, we could determine the amount of adsorbed TNF- $\alpha$ . For example, for a weight dose of 1200  $\mu\text{g/ml}$  of boehmite in contact with the macrophage cell line, the concentration of TNF- $\alpha$  released after 24 h in the supernatant was about 300 pg/ml (Figure 4); i.e., 1.25 pg of TNF- $\alpha$  in solution per microgram of boehmite initially introduced. The adsorption isotherm (Figure 7) led us to estimate that if there was 1.25 pg of TNF- $\alpha$  in the supernatant per microgram of boehmite, 0.2 pg of TNF- $\alpha$  was adsorbed per microgram of boehmite. Since the mass of boehmite introduced per wells was 12  $\mu\text{g}$ , we calculated that 2.4 pg of TNF- $\alpha$  would be adsorbed on boehmite. Therefore after a 24-h incubation for a weight dose of 1200  $\mu\text{g/ml}$  of boehmite, we estimated 26% of  $\Delta m$  TNF- $\alpha$  artifacts, taking into account adsorption and degradation phenomena.

## Discussion

There have been concerns in recent years about the effects of NP on health (Oberdorster et al., 2005). Many studies have described the pro-inflammatory effects of different NP, particularly in the respiratory system, which represents the main route of exposure (Oberdorster et al., 2005; Singh et al., 2007; Xia et al., 2006).

The binding of proteins to NP surfaces is a well-known phenomenon that is specific to the NP surface characteristics and also depends on the nature of the proteins. For instance, adsorption of TNF- $\alpha$  on carbon black and titanium dioxide NP has been reported, and the adsorption of other cytokines such as IL-6 and GM-CSF has also been observed (Val, 2009). Models describing the kinetics of the adsorption of the proteins on NP have been established (Dell'Orco et al., 2010; Xia et al., 2010). The main objective of the present work was to provide new insight on the possible artifacts of measures that could occur during *in vitro* toxicity assessments. We focused our attention on TNF- $\alpha$ , evaluating its adsorption and degradation. We aimed to demonstrate that a correction could be established to avoid underestimating cytokine release in the presence of nanoparticles that might have a high adsorption capacity due to their huge surface area. Owing to a lack of data in the literature about TNF- $\alpha$  adsorption on nanoparticles, we selected boehmite to illustrate that the potential impact of artifacts associated with nanoparticles is not negligible. To that purpose, *in vitro* TNF- $\alpha$  measurements were performed in a cell-free environment or after contact with a macrophage cell line.

First, different techniques were used for physicochemical characterization to evaluate the size of primary particles. All techniques yielded the same conclusions: boehmite nanoparticle size is about 10 nm, and the particles have a strong tendency to aggregate in suspension. The DLS technique was used to assess the state of NP aggregation in cell culture medium and in water, and the observations of different sized NP aggregates in cell culture

medium were in agreement with literature reports (Limbach et al., 2005; Singh et al., 2007; Xia et al., 2006). However, the size of aggregates depended on the pH of the solution as measured by variations of the zeta potential (Turci et al., 2010). For boehmite NP, aggregation increased with the pH.

Secondly, the pro-inflammatory effect of boehmite NP was evaluated after 24-h contact with macrophages. In a global manner, TNF- $\alpha$  production was limited (about 300 pg/ml) compared with the positive control for toxicity (800–1000 pg/ml).

In order to check the accuracy of our results and eliminate potential experimental biases, we investigated whether TNF- $\alpha$  degraded over time and whether it could be adsorbed at the surface of the NP and on the support. Indeed, adsorption caused a strong underestimation of the amount of TNF- $\alpha$  release as quantified by ELISA. To that purpose, we introduced a defined amount of TNF- $\alpha$ (1500 pg/ml) in solution, in cell-free conditions with and without boehmite NP, and we quantified the amount of degraded and/or adsorbed TNF- $\alpha$ . We were able to establish the following relationship:

$$[\text{TNF-}\alpha]_{\text{in the supernatant}} = [\text{TNF-}\alpha]_{\text{produced by cells}} - [\text{TNF-}\alpha]_{\text{adsorbed on (NP+wells)}} - [\text{TNF-}\alpha]_{\text{degraded}}$$

[2]

Each term of this equation was studied, and the disappearance of TNF- $\alpha$  over time and as a factor of temperature was observed. When 75 pg of TNF- $\alpha$  was added to 12  $\mu\text{g}$  of NP in cell culture medium, the mass of TNF- $\alpha$  measured after 24 h at 37 °C was only 58 pg, representing a loss of 26 wt%. We specifically established that 7 wt% TNF- $\alpha$  was degraded, 6 wt% TNF- $\alpha$  was adsorbed on walls of wells, and 13 wt% TNF- $\alpha$  was adsorbed on the boehmite NP surface.

However, results may depend on the biomolecules and the type of NP studied. For instance, Val (2009) showed that IL-6 was not adsorbed on carbon black and titanium dioxide, but in contrast GM-CSF and TNF- $\alpha$  were completely adsorbed by carbon black and partially by titanium dioxide (60% for GM-CSF and 26% for TNF- $\alpha$ ). Our results are in agreement with this study. We observed an adsorption of TNF- $\alpha$  on boehmite NP and on the support of the assays, but we also demonstrated disappearance of TNF- $\alpha$  due to degradation.

Keeping in mind the models describing the kinetics of the adsorption of the proteins on NP (Dell'Orco et al., 2010; Xia et al., 2010), we performed a kinetic study. Results allowed us to plot a corrective curve for when the thermodynamic equilibrium was reached for different ratios of NP to TNF- $\alpha$ , which led us to establish a correction to avoid misinterpretation of TNF- $\alpha$  release in the presence of nanoparticles.

Biomolecule adsorption onto material surface (e.g., nanoparticles) occurs by multiple short-range interactions (H-bond, electrostatic, van der Waals or dispersive forces, hydrophobic effect) that are individually rather weak (a few  $k_bT$  or less), but additively they induce significant adsorption energy. The classic view of Langmuir isotherms assumes that some interaction energy is reversibly available to create a biomolecule–material surface complex. The amount of adsorbed biomolecules is limited by the available area on a material's surface, thus the surface area of nanoparticles is doubtless a key parameter influencing the adsorption artifact in *in vitro* nanotoxicology experiments. Moreover, when the NP surface is functionalized or covered with a given biomolecule, its surface properties are changed, and this modifies the adsorption of other biomolecules remaining in solution. As a result, nonspecific adsorption of proteins such as bovine serum albumin or casein can be proposed to sterically “block” the material surface so as to prevent the unwanted adsorption of valuable and interesting biomolecules such as cytokines. Nevertheless, as the physicochemical features of a surface compose a key point to be taken into account in nanotoxicology studies,

the saturation of nanoparticles' surfaces may strongly modify the biological activity compared with uncoated nanoparticles.

In conclusion, we have studied the physicochemical characteristics of boehmite NP and their capacity to adsorb a specific biomolecule, TNF- $\alpha$ , which is often assessed in *in vitro* toxicological studies. Results showed the existence of an adsorption process conjugated with degradation, leading to underestimation of the actual amount of TNF- $\alpha$  released during *in vitro* toxicity assays. To our knowledge, this is the first study introducing a correction that takes artifacts into account and is adaptable to other types of biomolecules and NP.

#### **Conflict of interest statement**

The authors report no conflicts of interest.

## FIGURES

Figure 1: SEM (A) and TEM (B) images of particles

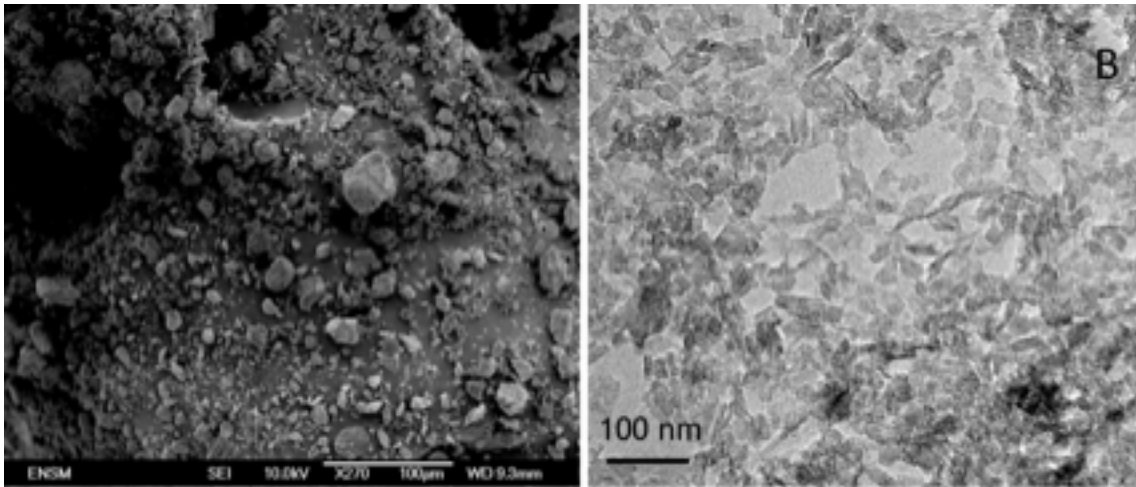


Figure 2: Diffractogram of the boehmite NP.

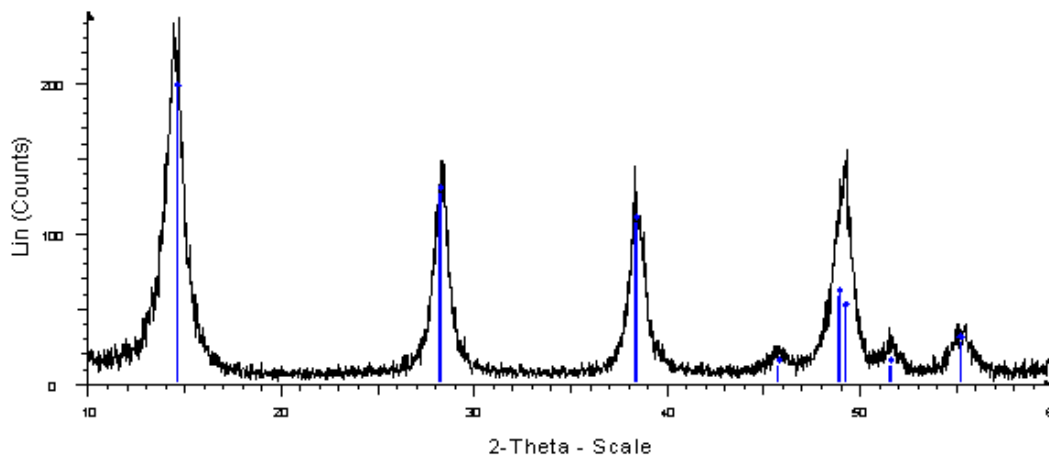


Figure 3: Average diameter of particles depending on the pH in water and variation of zeta potential.



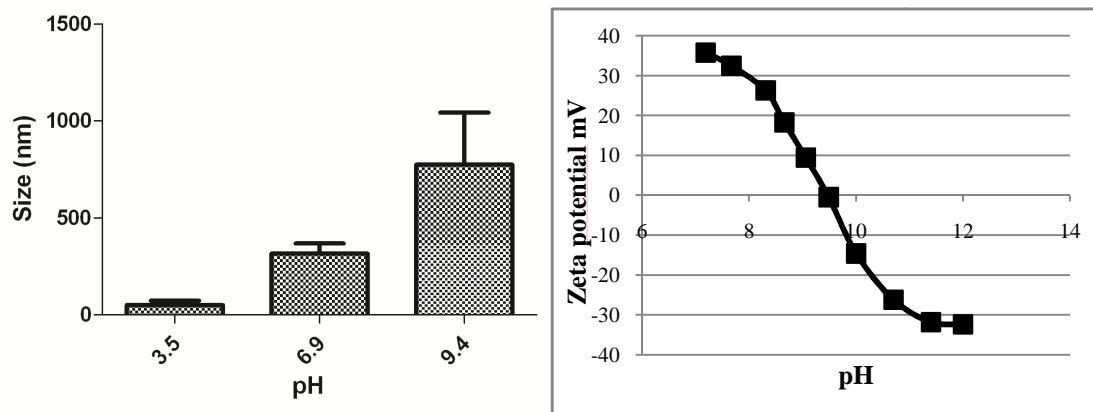
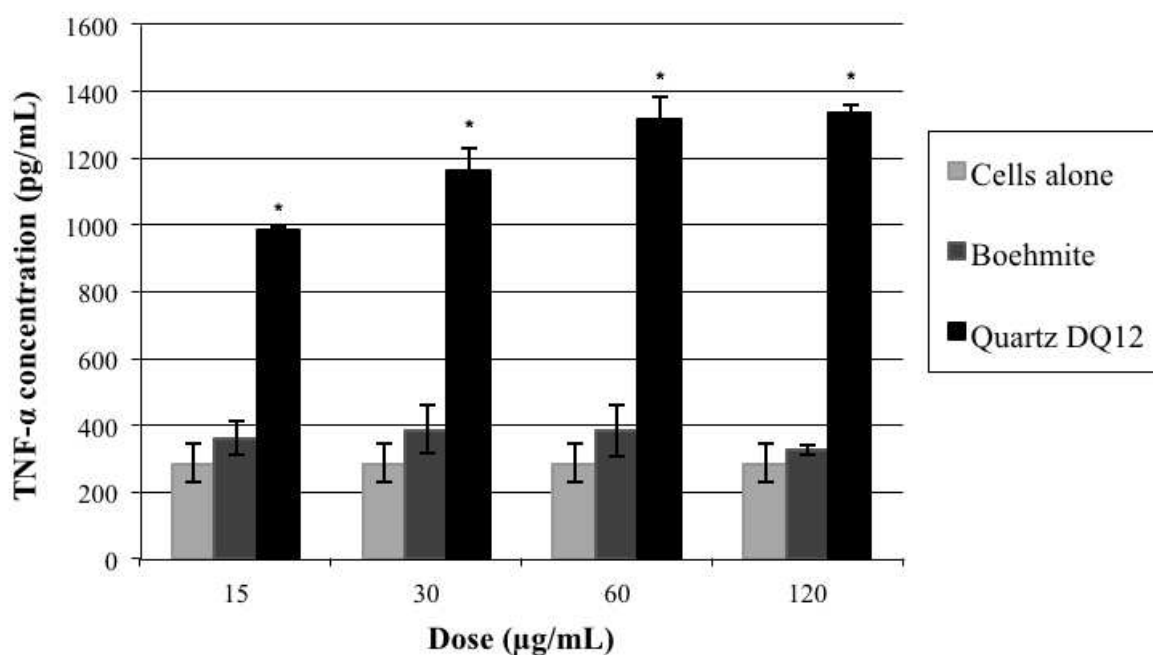


Figure 4: Toxicity assessment: RAW 264.7 cells were incubated with boehmite NP for 24h and the TNF- $\alpha$  production (pg/ml) was assessed (A) and cell damage measured by the amount of LDH released (B). This production was compared to that of cells alone (negative control of toxicity) and to that of cells incubated with DQ12 quartz (positive control) (n = 3, \*P < 0.0001).

A.



B.

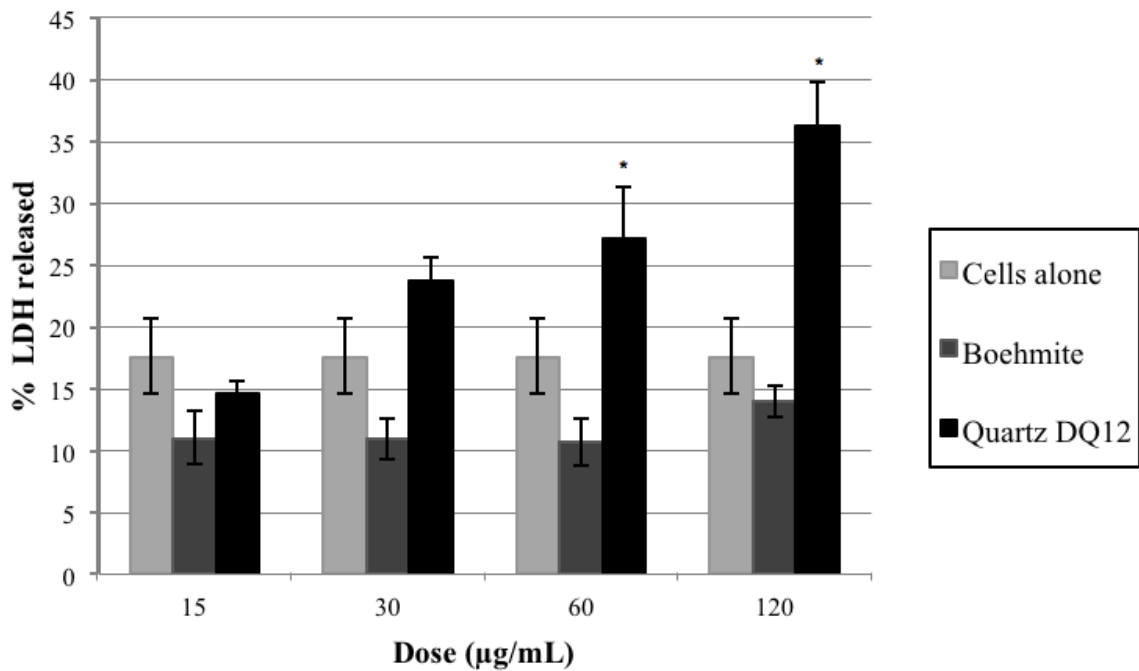


Figure 5: Adsorption of TNF- $\alpha$  depending on the temperature (4°C or 37°C), the duration of incubation (3, 16, 24 and 48h), the nature of the support (polystyrene or glass) and the presence or not of boehmite NP in cell free conditions.

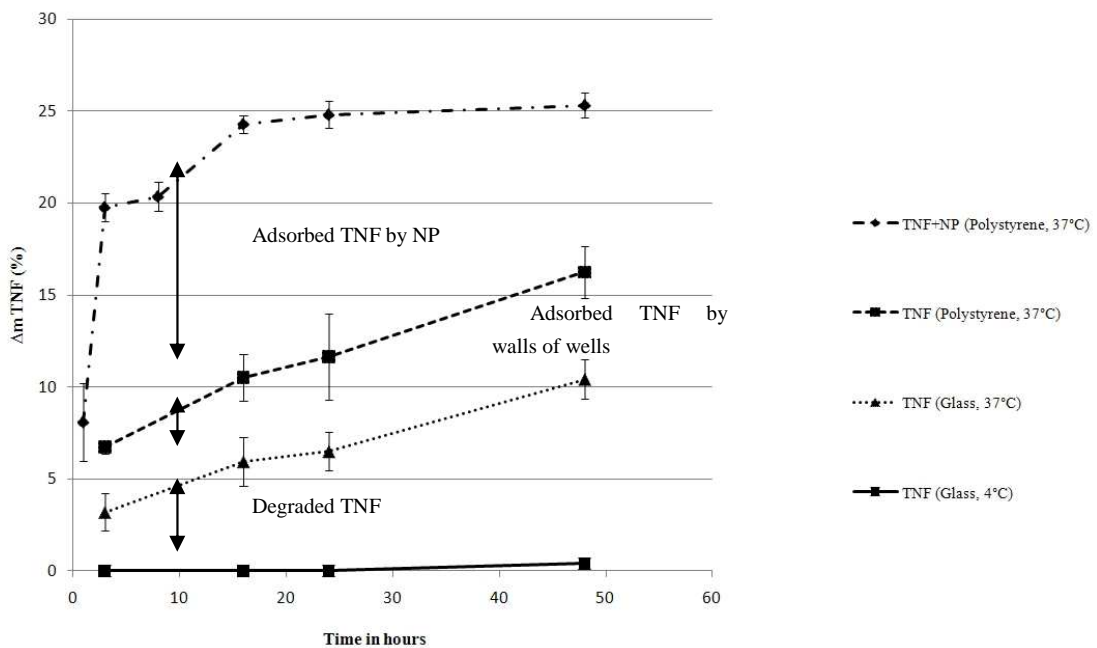


Figure 6: Adsorption kinetics of ratios mass boehmite NP per mass of TNF-  $\alpha$  (0.78, 1.56, 3.13, 6.25) for different times (1h, 3h, 16h, 24h).

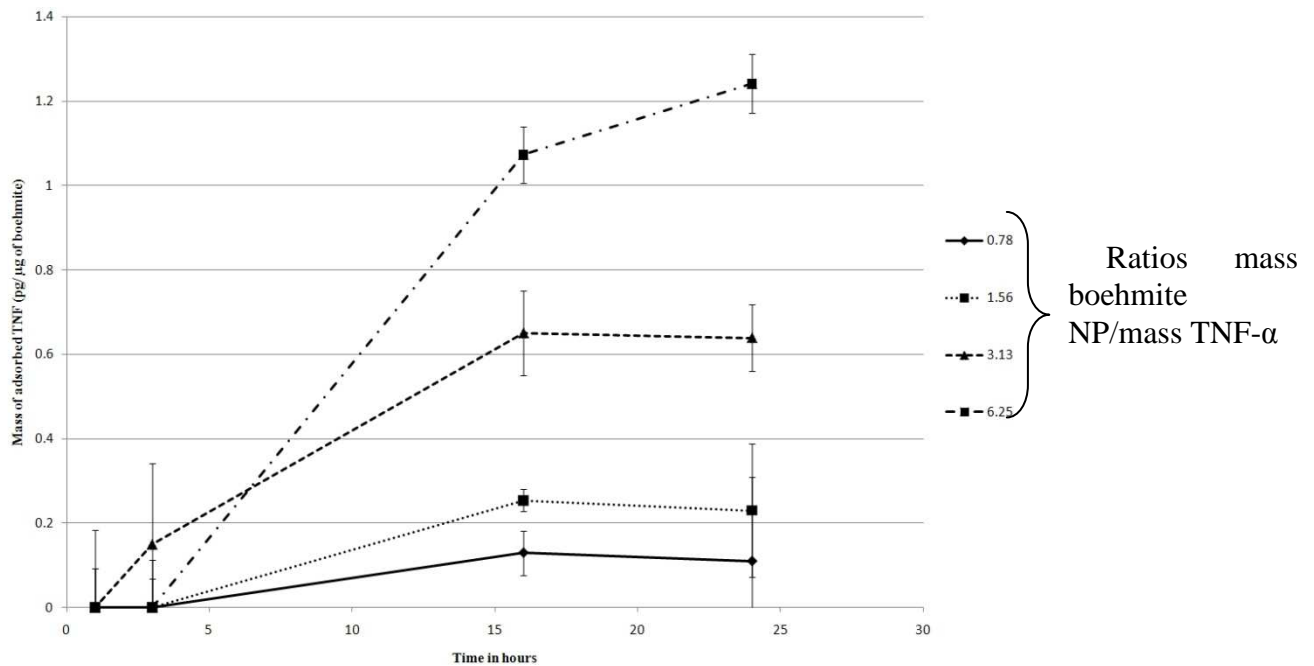
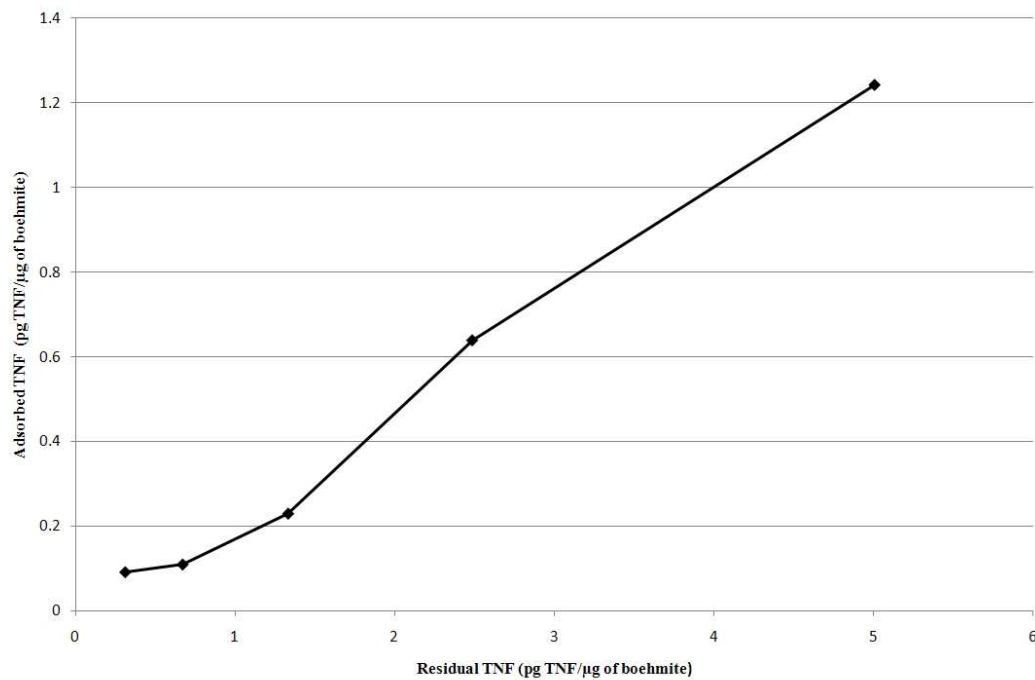


Figure 7: Corrective curve representing the adsorbed TNF-  $\alpha$  depending on the residual TNF-  $\alpha$  after 24h of incubation.



## References

- Akhtar, U.S. et al., 2010. Cytotoxic and proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles. *Inhal. Toxicol.* 22(Suppl. 2), 37–47.
- Boczkowski, J., Hoet, P., 2010. What's new in nanotoxicology? Implications for public health from a brief review of the 2008 literature. *Nanotoxicology*, 4 1–14.
- Bruch, J. et al., 2004. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 203–16.
- Cedervall, T. et al., 2007. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 2050–2055.
- Chen, W., Zhang, J., Joly, A., 2004. Optical properties and potential applications of doped semiconductor nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 919–947.
- Dell'Orco, D. et al., 2010. Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PLoSOne* 5, e10949.
- Geys, J., Nemery, B., Hoet, P.H.M., 2010. Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: Better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicol. in Vitro* 24, 620–629.
- Horie, M. et al., 2009. Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 543–553.
- Kroll, A. et al., 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 370–377.
- Kuhlbusch, T.A.J. et al., 2009. NanoCare: Health related aspects of nanomaterials.

- Leclerc, L. et al., 2010. Quantification of microsized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhal. Toxicol.* 22, 1091–1100.
- Limbach, L. et al., 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9370–9376.
- Monteiro-Riviere, N., Inman, A., Zhang, L., 2009. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 222–235.
- Murdock, R. et al., 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to In vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol. Sci.* 101, 239–253.
- Murphy, C. et al., 2005. Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *J. Phys. Chem. B* 109, 13857–13870.
- Nohynek, G. et al., 2007. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit.Rev.Toxicol.* 37, 251–277.
- National Science Foundation (NSF). 2003. “ The future of National Nanotechnology Initiative, program announcement. Boston, Available online: <http://www.nsf.gov/nano>.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Singh, S. et al., 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: Role of the specific

surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 141–151.

Somasundaran, P., Krishnakumar, S., 1997. Adsorption of surfactants and polymers at the solid-liquid interface. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 123, 491–513.

Turci, F. et al., 2010. An integrated approach to the study of the interaction between proteins and nanoparticles. *Langmuir* 26, 8336–8346.

Val, S., 2009. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: Need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhal. Toxicol.* 21, 115–122.

Xia, T. et al., 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 6, 1794–1807.

Xia, X.-R., Monteiro-Riviere, N.A., Riviere, J.E., 2010. An index for characterization of nanomaterials in biological systems. *Nat. Nanotechnol.* 5, 671–675.







École Nationale Supérieure des Mines  
De Saint-Étienne

NNT : 2012 EMSE 0646

Mélanie PAILLEUX

*IN VITRO* STUDY OF BOEHMITE NANOPARTICLES TOXICITY

Speciality: Process engineering

Keywords: boehmite, nanoparticles, physico-chemical characterization, *in vitro* toxicity, RAW 264.7 macrophages, TNF- $\alpha$  adsorption

Abstract:

Exposure to manufactured nanoparticles, especially through inhalation, may constitute a potential risk factor for human health. Although the impact of nanoparticles on health is still not well-defined, nano-aerosols in industrial environment are the topic of prevention protocols. In this context, manufacturers are increasingly seeking to assess the biological toxicity of handled particles and even more after the harmful effects attributed to asbestos. This study aimed at a better understanding of the biological effects of boehmite nanoparticles by carrying out *in vitro* tests using a macrophage-like cell line (RAW 264.7), as macrophages represent the first target cells in the respiratory tract. Different cellular responses: inflammation (evaluated by the release of TNF- $\alpha$ ), cell death (assessed by the release of LDH), and oxidative stress (production of ROS) were studied in relation to physico-chemical properties of the particles (size, surface morphology, crystal structure, chemistry, roughness, radical activity). In the first part of this work, the biological activity was measured using boehmite nanoparticles obtained either from industrial environment or by hydrothermal synthesis, and after grinding or dispersion that enabled us to observe the influence of particle size on the cellular response.

The results, illustrated by a vector model representing simultaneously the four parameters (TNF- $\alpha$ , LDH, ROS and TOX), point out that industrial boehmite particles are mainly characterized by a moderate pro-inflammatory activity, no cytotoxic effect and no significant oxidative stress. Differences depending on the size of the particles were observed on the inflammatory and cytotoxic parameters.

However, the assessment of biomolecules released into cell culture supernatants may be biased by the adsorption of biomolecules on the nanoparticles. Thus, the adsorption mechanism must be fully understood to avoid misinterpretation of the results. Therefore, the second aim of this work was to develop a methodology to assess the organo-mineral interactions in terms of affinity and quantity of biomolecules adsorbed on the nanoparticles at the thermodynamic equilibrium and to determine a correction law. We focused more specifically our study on TNF- $\alpha$ .

École Nationale Supérieure des Mines  
de Saint-Étienne

NNT : 2012 EMSE 0646

Mélanie PAILLEUX

ETUDE *IN VITRO* DE LA TOXICITE DE NANOPARTICULES DE BOEHMITE

Spécialité: Génie des procédés

Mots clefs: boehmite, nanoparticules, caractérisations physico chimiques, toxicité biologique *in vitro*, macrophages RAW 264.7, adsorption de TNF- $\alpha$

Résumé:

L'exposition à des nanoparticules manufacturées constitue un risque potentiel pour la santé notamment lors de leur possible inhalation. Bien que le risque sanitaire induit par les nanoparticules soit encore assez mal défini, les nano-aérosols présents dans les ambiances industrielles font l'objet de protocoles de prévention. Dans ce cadre, les industriels sont aussi de plus en plus demandeurs d'évaluation de la toxicité biologique des particules manipulées, et ce d'autant plus après les effets nocifs imputés à l'amiante. Cette étude a pour objectif d'apporter des éléments de réponse à la compréhension de la nature et de l'origine des effets biologiques des nanoparticules de boehmite en réalisant des tests de contacts *in vitro* sur des macrophages de culture (RAW 264.7), les macrophages étant la cible cellulaire privilégiée au niveau du tractus respiratoire. Différents domaines de la réponse cellulaire (état d'inflammation par libération du TNF- $\alpha$ , mort cellulaire par relargage de la LDH, stress oxydant par production de ROS) en relation avec les propriétés physico-chimiques des particules (taille, surface, morphologie, structure cristallographique, chimie, état de surface, activité radicalaire) ont été étudiés. Dans une première partie l'activité biologique a été mesurée sur des nanoparticules de boehmite d'origine industrielle ou obtenues par synthèse hydrothermale, puis après broyage ou dispersion permettant d'observer en particulier l'influence de la taille des particules dans la réponse cellulaire.

Les résultats, illustrés suivant un modèle vecteur représentant simultanément les quatre paramètres biologiques évalués (TNF- $\alpha$ , LDH, ROS et TOX), soulignent que les particules industrielles de boehmite sont principalement caractérisées par une activité modérée au niveau de la réponse inflammatoire, mais sans effet cytotoxique ou sans stress oxydant significatif. Des différences en fonction de la taille des particules ont été observées sur les paramètres inflammatoire et cytotoxique.

Toutefois, les mesures des biomolécules libérées dans les surnageants de culture cellulaire peuvent être biaisées par l'adsorption de ces biomolécules sur les nanoparticules en présence. Ainsi, ce mécanisme d'adsorption doit être pleinement compris pour éviter une interprétation erronée des données obtenues. Dans un second temps l'objectif a donc été d'élaborer une méthodologie afin d'évaluer les interactions organo-minérales en terme d'affinité et de quantité de biomolécules adsorbées sur les nanoparticules à l'équilibre thermodynamique et de déterminer une loi de correction. Dans ce contexte nous sommes intéressés en particulier au TNF- $\alpha$ .