

# Impacts des nanotubes de carbone sur la santé : relation structure effets inflammatoires

Amel HADJ-ZIANE-ZAFOUR | amelzafour@yahoo.fr

Université SAAD DAHLAB Blida 1, Génie chimique, Blida, Algérie

Mots clés : Cellules THP-1, immunité innée, inflammation, instillation intratrachéale, nanotubes de carbone, toxicité

Les nanomatériaux manufacturés représentent les briques de base des nanotechnologies. La recherche a déjà conduit à des percées significatives et plusieurs produits contenant des nanoparticules sont commercialement disponibles au niveau du grand public. Il est actuellement envisagé que le nombre de travailleurs exposés, aussi bien aux niveaux de l'utilisation et de la transformation qu'au niveau de la production, va augmenter au cours des prochaines années.

Découverts depuis à peine plus de deux décennies, les nanotubes de carbone constituent une nouvelle forme de carbone. Ces nano objets ressemblent aux micropoussières d'amiante, ayant au moins deux dimensions dans l'échelle nanométrique, ce sont des objets cylindriques qui peuvent être divisés en deux grands groupes: les nanotubes de carbone à paroi simple (SWCNT\*), qui sont constitués d'une feuille de graphène, enroulés sous forme de tube cylindrique, et des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT\*) constitués de plusieurs tubes concentriques. En raison de leurs propriétés exceptionnelles comme la conductivité électrique, la résistance mécanique et la conductivité thermique, ils sont largement utilisés dans divers secteurs industriels tels que l'électronique, l'aérospatiale ou de la nanomédecine.

Cependant, ces propriétés physico-chimiques intrinsèques soulèvent également la question de leurs effets sur la santé humaine. Malgré les études réalisées *in vitro* (cellules en culture) ou *in vivo* chez les rongeurs, les données toxicologiques restent insuffisantes pour affirmer la toxicité de ces nanoparticules pour l'Homme. Des nanotubes monofeuillets instillés chez les souris induisent une réponse inflammatoire pulmonaire aigüe associée à une réponse fibrosante retardée (1). Une réponse pulmonaire inflammatoire a été retrouvée dans l'étude menée *in vivo* avec des CNT\* multifeuillets, par Muller et al.(2). De leur côté, Lam *et al.* (3) ont exposé des souris aux nanotubes de carbone monofeuillets par instillation intra-trachéale. Les poumons des animaux exposés aux nanotubes de carbone présentent des granulomes, dont le nombre augmente en fonction du temps et de la dose. Warheit et al. (4) ont observé les mêmes résultats chez les rats.

Cette note montre l'étude de la toxicité de trois structures de nanotubes de carbone (les mono et multiparois dans la première publication et les doubles parois dans la seconde) sur des animaux ou des cellules en culture. Les auteurs des deux articles ont montré une relation directe entre la structure et la taille de ces nanomatériaux avec les réponses inflammatoires des voies respiratoires et du système immunitaire inné.

## Effets inflammatoires pulmonaire et pleurale des nanotubes de carbones mono et multiparois

Fujita K. et al. (2016) Pulmonary and pleural inflammation after intratracheal instillation of short single-walled and multi-walled carbon nanotubes, *Toxicology Letters* vol.257: p 23–37

### Résumé

Les auteurs de cette publication ont étudié la relation entre les propriétés physico-chimiques (taille, structure) des nanotubes de carbone (SWCNT et MWCNT) et leur influence sur les voies respiratoires faisant suite à certains travaux antérieurs (5). Ils signalent des inflammations pulmonaire et pleurale chez le rat par instillation intratrachéale. Pour cette étude, les nanotubes de carbone mono et multiparois ont été dispersés dans une solution d'albumine sérique à 10mg/ml. Les suspensions obtenues ont été analysées par UV-Vis et l'analyse granulométrique réalisée par Zetasizer. Les tests *in-vivo* ont été réalisés avec des rats Wistar mâles, trois groupes de neuf rats préalablement pesés. Des suspensions de nanotubes (1.5 mg/Kg) ont été administrées par voie intratrachéale.

L'effet des CNT a été étudié après 1, 3, 7, 30 et 90 jours post-instillation. Les données du lavage broncho-alvéolaire et l'analyse du liquide histopathologique ont montré que les SWCNT causent une inflammation pulmonaire persistante. Les MWCNT courts se logent dans les alvéoles immédiatement après l'instillation. Le comptage des cellules, des protéines totales et le dosage de cytokines dans les poumons et la cavité pleurale, les examens histopathologiques ainsi que l'évaluation de l'expression génétique ont été réalisés sur les poumons des rats après 90 jours. Les ganglions lymphatiques médiastinaux ont été observés par microscopie électronique à transmission et les données normalisées des biopuces ont été analysées avec le logiciel GeneSpring GX. Les auteurs ont souligné que pour les SWCNT et les MWCNT, des tâches rouges ont été observées dans les poumons ; des macrophages chargés en nanotubes ont été identifiés et leur accumulation dans les alvéoles est la source de l'inflammation pulmonaire qui dépend fortement du temps d'exposition et de la dose administrée. Pour les nanotubes courts, les analyses ont révélé que les réponses inflammatoires apparaissent rapidement dans le cas des SWCNT, c'est-à-dire un jour après l'instillation, alors

que la mise en évidence de ces effets nécessite plus de temps lorsqu'il s'agit des MWCNT.

### Commentaire

L'étude publiée dans cet article montre clairement que la taille des nanotubes de carbone pourrait avoir, après inhalation, un effet significatif sur la santé avec l'apparition d'inflammations pulmonaires et pleurales. Selon la structure de ces nanomatériaux (nombre de parois, longueur du tube), l'effet diffère et ceci a été signalé par les auteurs qui suggèrent que chaque classe soit étudiée séparément. La méthodologie adoptée est très concise et les analyses réalisées ont pu apporter de nouveaux éléments de réponse sur l'influence de la structure des nanotubes de carbone qui reste un volet où les données sont très limitées. Cette publication constitue ainsi une base de nouvelles données. Cependant le problème majeur des nanotubes de carbone synthétisés est leur tendance à se regrouper en agrégats et leur mise en suspension nécessite l'ajout d'un agent de dispersion telle l'albumine de sérum bovin.

La caractérisation des dispersions pourrait apporter une idée plus claire sur l'état d'individualisation des CNT, car cela constitue toujours un obstacle pour les études de toxicité et d'éco-toxicité. De son côté, l'albumine de sérum bovin peut s'agglomérer dans les cavités respiratoires et son mécanisme d'action pourrait être différent de ce qui a été signalé. Ce volet doit être exploité avec précision. D'autre part, les doses de nanotubes de carbone étudiées et les délais d'exposition peuvent ne pas refléter la réalité de l'exposition des travailleurs dans le secteur industriel. Les auteurs ont suggéré que compte tenu du nombre très réduit de données, l'étude nécessite d'être complétée par l'identification des mécanismes d'action des SWCNT et MWCNT courts, utilisés individuellement. Des études systémiques des CNT après l'inhalation s'avèrent plus que nécessaires.

### Impact de l'exposition aux nanotubes de carbones biparois sur le système immunitaire inné

**Dekali S.** et al. (2016) Biological effects of double-walled carbon nanotubes on the innate immune system: An in vitro study on THP-1 human monocytes. *Toxicology*, vol. 365: p 1-8

#### Résumé

Cette étude *in vitro* concerne les effets biologiques des nanotubes de carbone à double parois sur des cellules monocytaires humains THP-1. Les DWCNT\* biparois ont été synthétisés par dépôt chimique en phase vapeur. Après caractérisation, ils ont été mis en suspension (concentration de 200 µg/mL). Les suspensions cellulaires de monocytes humains THP-1 ont été exposées aux DWCNT à différentes concentrations (0, 10, 25 et 50 µg/mL). La gamme de concentration utilisée ne montre pas de cytotoxicité aux différents temps d'incubation (6 h, 24 h, 48 h et 72 h). Pendant ces périodes d'incubation avec les DWCNT, l'adhésion cellulaire des THP-1 a été évaluée par la technologie xCELLigence. Après 24 heures d'exposition, des agglomérats de DWCNT ont été observés et localisés dans le cytoplasme des monocytes THP-1 ainsi qu'une augmentation significative de l'expression des protéines de surface des

cellules. La sécrétion de cytokines a été mesurée dans les surnageants après 6 h ou 24 h d'exposition aux DWCNT. Cette réponse pro-inflammatoire est augmentée dans les cellules THP-1 qui ont été prétraitées au LPS\*.

Compte tenu des résultats trouvés, les auteurs considèrent que les DWCNT induisent une réponse pro-inflammatoire dans les monocytes THP-1 et semblent moduler l'expression des protéines de surface. Les DWCNT pourraient agir comme stimulateurs de l'immunité innée.

### Commentaire

La caractérisation des DWCNT synthétisés a permis de préciser la taille et la structure de ces nanomatériaux. Bien que les DWCNT soient suspendus dans l'albumine de sérum bovin (agent de dispersion), les auteurs observent un état d'agglomération de ces nanotubes de carbone à concentration relativement élevée dans les milieux de culture.

Les cellules THP-1 semblent moins sensibles aux DWCNT que d'autres types cellulaires (6), ce qui explique la faible cytotoxicité observée. La concentration en DWCNT et la durée d'exposition sont les facteurs déterminants pour cette étude. Ces travaux réalisés *in-vitro* associés aux précédents, posent des jalons pour les déterminants d'études visant l'exposition des travailleurs aux DWCNT, i.e. la durée d'exposition étant plus longue que celle mis en œuvre dans ces articles.

### CONCLUSION GÉNÉRALE

L'exposition aux nanotubes de carbone présente un risque pour la santé des travailleurs. En effet, la première publication a mis en évidence l'influence de la taille des nanotubes de carbone sur le système respiratoire. Par des études *in-vivo*, les SWCNT et MWCNT courts ont causé l'inflammation des poumons et de la plèvre et se dispersent rapidement dans le corps après inhalation. De par leur structure, les multiparois réagissent moins rapidement que les monoparois.

Les DWCNT, intermédiaires entre les deux types précédents de nanotubes et objet de la deuxième publication ont aussi montré *in-vitro* que des monocytes présentent une réponse inflammatoire et un effet stimulateur significatif du système immunitaire inné

Enfin, en raison des natures spécifiques de ces nanomatériaux, les résultats de la deuxième publication peuvent être extrapolés aux SWCNT et MWCNT. Les CNT à différentes structures peuvent manifester des réponses inflammatoires au niveau des poumons et de la plèvre et sont immunomodulateurs.

Compte tenu du nombre actuel limité de données sur la toxicité des nanotubes de carbone à structures variées, des précautions particulières seraient à prendre pour des travailleurs dans le secteur des nanotechnologies.

## GENERAL CONCLUSION

*The carbon nanotube has an evident effect on workers' health. In fact, the effect of the carbon nanotube size on the respiratory system has been discussed earlier in the first published article. The in-vivo experimental work demonstrated a quick dispersion of the short SWCNT and MWCNT shortly after being inhaled followed by a severe lungs and pleura inflammatory. Due to their structure, the multi-walls interact slowly compared to the single-walls.*

*The study effect (second article) of The DWCNT considered as an intermediate between the previous two types conducted in-vitro on monocyte, demonstrated an inflammation response and display a strong stimulator of the innate immune system as well.*

*Owing to their specific nature, the results obtained from the second article can be extrapolated to the SWCNT and MWCNT. The CNT can show a lungs and pleura inflammatory response and are considered as immunomodulators.*

*Because of the limited data regarding the toxicity of the carbon nanotube with different structure nowadays, a specific precaution must be taken by workers which are evolving in the nanotechnology area.*

## Lexique

**BSA** : albumine de sérum bovin

**CNT** : nanotubes de carbone

**DWCNT** : Double walled carbon nanotubes (nanotubes à double parois)

**LPS** (lipopolysaccharide) : composant essentiel de la face externe des bactéries à Gram négatif. C'est une endotoxine pyrogène.

**MWCNT** : multi walled carbon nanotubes : (nanotubes multiparois)

**SWCNT** : single walled carbon nanotubes (nanotubes monoparois)

## Publications de référence

**1 Shvedova A.** et al. (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol.*, vol.289(5), L698-L708.

**2 Muller J.** et al. (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 207, p221– 231.

**3 Lam C.-W.** et al. (2004). Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. *Toxicological Sciences*, 2004, 77, p126-134.

**4 Warheit D.B.** et al. (2004). Comparative pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicological Sciences*, vol.77; p117-125.

**5 Boczkowski J.** et al. (2012). Respiratory toxicities of nanomaterials — A focus on carbon nanotubes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.64; p1694–1699

**6 Fiorito S.** et al. (2014). Redox active Double wall carbon nanotubes show intrinsic anti-proliferative effects and modulate autophagy in cancer cells. *Carbon*, vol.78;p 589–600

## Revue de la littérature

**Makoto E.** et al. (2016). A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol.74: p 42-63

**Allegri M.** et al. (2016). Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration, *Toxicology Reports*, vol.3: p 230–243

## Autres publications

**Louro H.** et al. (2016). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. *Toxicology Letters*, vol. 2: p123–134

**Park E.-J.** et al. (2016). Single-walled carbon nanotubes disturbed the immune and metabolic regulation function 13-weeks after a single intratracheal instillation. *Environmental Research*, vol.148: p184–19

**Mannerström M.** et al. (2016). The applicability of conventional cytotoxicity assays to predict safety/toxicity of mesoporous silica nanoparticles, silver and gold nanoparticles and multiwalled carbon nanotube. *Toxicology in Vitro*, vol.37: p113-120

## Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.