

Impacts physiopathologiques des nanoparticules inhalées

Armelle Baeza-Squiban

Université Paris-Diderot, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, UMR CNRS 8251, Laboratoire des Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, 5 rue Thomas Mann, 75013 Paris, France

Auteur correspondant : Armelle Baeza-Squiban, baeza@univ-paris-diderot.fr

Reçu le 9 juillet 2014

Résumé – Le développement des nanotechnologies s'accompagne de la production de nanomatériaux qui se caractérisent par une dimension externe à l'échelle nanométrique, de 1 nm à 100 nm, ou qui au moins possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. À cette échelle, ces matériaux acquièrent des propriétés nouvelles que ne possèdent pas des matériaux de même nature mais de taille micrométrique, expliquant leur utilisation croissante dans une multitude de secteurs. Mais ces nouvelles propriétés font craindre que ces nanoparticules manufacturées puissent interagir avec les systèmes biologiques, ce qui nécessite d'évaluer leur danger. La production croissante de nanomatériaux augmente les probabilités d'exposition, tant pour la population générale que pour les travailleurs, et la voie respiratoire est une voie d'entrée majeure dans le cadre d'expositions non intentionnelles. La taille réduite des nanoparticules favorise leur pénétration profonde dans l'appareil respiratoire où elles vont se déposer par diffusion, interagir avec les cellules épithéliales et les macrophages, voire passer les barrières épithéliales pour atteindre la circulation sanguine. L'inhalation des nanoparticules provoque à court terme une inflammation pulmonaire dont l'importance est dépendante de leurs caractéristiques physico-chimiques telles que la composition, la taille, la forme, la solubilité... La diminution de taille s'accompagne de propriétés de surface particulières qui confèrent aux nanoparticules une forte réactivité biologique, liée notamment à leur capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène. Les mécanismes de toxicité des nanoparticules passent ainsi très souvent par l'induction d'un stress oxydant. Mais cette réactivité de surface favorise aussi des interactions avec des protéines qui s'adsorbent à la surface des nanoparticules. Selon les propriétés de surface des nanoparticules, la nature des protéines adsorbées ainsi que l'impact sur la structure de ces protéines peuvent varier, modulant la capacité des nanoparticules à interagir avec les cellules et d'activer des récepteurs/voies de signalisation cellulaire. Compte tenu du potentiel d'application des nanotechnologies et des retombées économiques associées, l'évaluation des risques potentiels de ces nanomatériaux pour la santé humaine dans le cadre d'expositions non intentionnelles, notamment par la voie respiratoire, est toujours d'actualité. De plus l'amélioration de nos connaissances sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules impliquées dans leur toxicité permettrait d'envisager la création de nanoparticules plus sûres.

Mots clés : Réactivité de surface / mécanisme de toxicité / internalisation / translocation / stress oxydant / inflammation pulmonaire

Abstract – Physio-pathological impacts of inhaled nanoparticles.

Nanomaterials are defined as materials with any external dimension in the nanoscale or having an internal structure or surface structure in the nanoscale, approximately 1 nm to 100 nm. They exhibit new or reinforced properties as compared to the same material at the micrometric scale, providing a benefit in numerous technological applications. However, their specific surface properties in addition to their

shape, composition, size are suspected to elicit adverse responses from biological systems, underlining the need for a thorough hazard assessment. Increasing use of nanomaterials in industrial as well as consumer products extends the possibilities of environmental and occupational human exposures. During all their life cycle, from their production to their destruction through their use, engineered nanoparticles can be released and the respiratory route is one of the main unintentional routes of exposure. Although the respiratory tract is equipped with efficient clearance mechanisms, there is increasing evidence that nanoparticles exhibit an ability to cross biological barriers, getting access to the bloodstream and secondary target organs. Different features of nanomaterials (size, form, surface reactivity...) contribute to their internalization and translocation through the respiratory barrier. Short term inhalation exposure to nanoparticles induces pulmonary inflammation the extent of which is dependent on the type of nanoparticles according to shape, size, solubility... Oxidative stress is considered as a major toxicity pathway triggered by nanomaterials as they can intrinsically produce reactive oxygen species or induced the intracellular production of reactive oxygen species or anti-oxidant depletion upon interaction with cells. Alternative mechanisms are suspected, related to the ability of nanoparticles to interact with proteins. As they get in contact with biological fluids, nanoparticles are covered by a protein corona that modifies their interactions with cells, their fate and their effects. There is still a need to increase our mechanistic understanding of the toxicological events triggered by nanomaterials in order to provide relevant data for risk assessment as well as in helping to develop nanomaterials with a safer design.

Key words: Oxidative stress / uptake / translocation / mechanisms of toxicity / surface reactivity / lung inflammation

Les nanotechnologies constituent un champ de recherche majeur aux applications tous les jours plus nombreuses et de nouvelles sont encore à venir. Elles concernent la conception, la caractérisation, la production et l'application de structures, dispositifs et systèmes par le contrôle de la forme et de la taille à une échelle nanométrique.

Ces nanotechnologies génèrent des nanomatériaux pour lesquels l'organisation internationale de normalisation donne la définition suivante : « un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique (environ de 1 nm à 100 nm) ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique ». Cette définition englobe plusieurs catégories de nanomatériaux telles que (i) les nanoparticules qui peuvent se présenter sous forme de poudre, de suspensions liquides ou d'aérosols libres ou agrégés, (ii) des nanomatériaux contenant des nanoparticules incorporées ou en surface du matériau et (iii) des matériaux nanostructurés dont les dimensions se situent en dehors de l'échelle nanométrique mais qui présentent une nanostructuration distribuée de façon homogène dans toute la particule ou bien localisée à la surface (Hansen *et al.*, 2007). À chacun de ces types de nanomatériaux sont associées des probabilités d'exposition différentes. Ainsi, lorsque les nanomatériaux sont sous forme de particules, notamment sous forme de poudre, les risques d'exposition par la voie respiratoire sont élevés. Celle-ci constitue une voie privilégiée

d'exposition pour les travailleurs impliqués dans la synthèse de ces nanoparticules ou leur utilisation pour la confection d'objets manufacturés les incluant. La probabilité d'exposition à des nanomatériaux nanostructurés est probablement très faible mais s'accroît pour les nanomatériaux contenant des nanoparticules. En effet, au cours de leur cycle de vie, des nanoparticules sont susceptibles d'être libérées, notamment par les phénomènes d'usure. L'accroissement du nombre de produits de consommation courante contenant des nanoparticules manufacturées augmente le risque d'exposition de la population générale à une grande diversité de nanoparticules. A l'heure actuelle, on trouve principalement des produits contenant des nanoparticules d'argent, de titane, de carbone ainsi que de silice (<http://www.nanotechproject.org/>, <https://www.r-nano.fr/>). À cette diversité de composition chimique s'ajoute une très grande diversité de formes car sous le vocable « nanoparticules », on englobe des nanotubes, des nanofils, des nanofeuillets, des nanocubes...

À l'échelle nanométrique, les particules acquièrent des propriétés nouvelles que ne possèdent pas les particules de même nature mais de taille micrométrique, ce qui justifie leur utilisation croissante dans une multitude de secteurs. Mais ces propriétés nouvelles font craindre que ces nanoparticules puissent interagir avec les systèmes biologiques. Il apparaît donc essentiel d'évaluer leur danger. Les potentiels d'applications et donc de retombées économiques étant importants,

il convient en amont d'évaluer les risques potentiels de ces nanomatériaux pour la santé humaine dans le cadre d'expositions non intentionnelles. Une meilleure compréhension des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules impliquées dans leur toxicité permettrait d'envisager la création de nanoparticules plus sûres.

Spécificités des nanoparticules

Les nanoparticules se caractérisent par une augmentation du rapport surface sur volume avec la diminution de taille, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la proportion de molécules en surface. Les nanoparticules présentent un excès d'énergie en surface et une structure cristalline modifiée (Auffan *et al.*, 2009). Cette surface est l'interface entre les nanoparticules et les molécules biologiques/cellules, qui va être le siège d'échanges chimiques (anions, cations), électrochimiques (électrons, protons) ou de réactions d'adsorption ou désorption.

L'évaluation toxicologique des nanoparticules reste complexe car plusieurs de leurs propriétés physico-chimiques peuvent contribuer à leur réactivité biologique. La toxicité peut être dépendante de la taille, de la composition chimique et notamment de la structure cristalline, de la forme, de la surface spécifique qui, pour une même taille de particules, peut être différente selon la porosité et la rugosité de la particule. Elle est aussi liée à la chimie de surface, ce qui fera qu'une nanoparticule sera plus ou moins hydrophobe, sera ou non chargée et/ou va se solubiliser dans les milieux biologiques. La surface spécifique et la chimie de surface vont conditionner la réactivité de surface des nanoparticules. De plus, lorsque les nanoparticules vont se retrouver dans les fluides biologiques, elles vont se recouvrir de molécules, dont des protéines, constituant ainsi une structure hybride qui est finalement celle avec laquelle les cellules vont interagir et qui leur confère leur identité biologique. Donc, ce que « voit » la cellule, ce n'est pas directement la nanoparticule, mais celle-ci associée aux molécules adsorbées qui peuvent être différentes selon la voie d'exposition (Monopoli *et al.*, 2012). La nature des molécules présentes dans la corona et leurs modifications structurales sont susceptibles de modifier le devenir de la nanoparticule dans l'organisme et sa toxicité (Deng *et al.*, 2011).

L'appareil respiratoire, cible des nanoparticules inhalées

Si le développement des nanotechnologies nous expose à une diversité croissante de nanoparticules, il faut savoir que l'exposition à des nanoparticules n'est

pas nouvelle puisque l'on trouve dans le compartiment aérien, des particules de taille nanométrique mais que classiquement on appelle particules ultrafines et qui sont soit d'origine naturelle (les volcans, les incendies) ou bien qui résultent de l'activité humaine telle que les activités industrielles ou les transports. Ce sont alors des particules issues de processus de combustion qui se distinguent des nanoparticules manufacturées par leur hétérogénéité en taille et en composition alors que les nanoparticules sont généralement monodisperses et ont une composition définie par source d'émission (Andujar *et al.*, 2009).

Les nombreuses études épidémiologiques et expérimentales sur les particules atmosphériques ont mis en lumière leur impact respiratoire et cardiovasculaire avec pour mécanisme sous-jacent l'induction d'une inflammation (Baeza & Marano, 2007). Compte tenu des connaissances acquises sur la toxicité des particules ultrafines atmosphériques, il est apparu légitime de s'interroger sur les effets délétères potentiels des nanoparticules manufacturées. Bien que les voies d'exposition aux nanoparticules soient multiples, la voie respiratoire est une voie d'entrée privilégiée, en particulier lors d'expositions non intentionnelles, compte tenu de sa grande surface d'échanges (environ 100–150 m²) et des grandes quantités d'air inhalées chaque jour qui sont de l'ordre de 10–15 m³.

Le mode et le site de dépôt des particules dans l'appareil respiratoire sont fonction de leur taille. Ainsi les particules micrométriques se déposent par impaction ou sédimentation dans les voies aériennes. Par contre, les nanoparticules, du fait de leurs faibles taille et masse, vont se comporter comme des gaz et vont pouvoir pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire jusqu'aux alvéoles où elles vont se déposer par diffusion. Des modèles prédictifs de dépôt des particules montrent un site principalement alvéolaire pour les nanoparticules supérieures à 5 nm, un dépôt quasi équivalent dans les différentes parties de l'arbre respiratoire pour les nanoparticules de 5 nm et un dépôt essentiellement nasopharyngé pour les nanoparticules inférieures à 5 nm (Witschger & Fabriès, 2005). Dans l'appareil respiratoire, les particules primaires ont cependant tendance à s'agréger et/ou s'agglomérer en formant des particules plus grosses. Si ces dernières conservent une taille inférieure à 100 nm, la diffusion reste le mécanisme majeur de dépôt mais si, par contre, elles dépassent les 300 nm, la densité de l'agrégat/agglomérat va conditionner les modalités du dépôt, qui augmente pour les plus denses (Braakhuis *et al.*, 2014).

L'appareil respiratoire est doté de systèmes de protection lui permettant d'épurer l'air des microorganismes et des particules inhalées (Baeza-Squiban & Lanone, 2011). Les voies aériennes du nez jusqu'aux bronches sont tapissées d'un épithélium mucociliaire

recouvert de mucus qui piège les particules. Grâce au battement des cils, le tapis de mucus est ensuite expectoré ou ingéré. Il s'agit de la clairance mucociliaire. Au niveau des alvéoles pulmonaires, les macrophages assurent la clairance alvéolaire par phagocytose des particules. Cependant la qualité de cette activité de phagocytose par les macrophages est variable selon le type de nanoparticules. Ainsi, les nanoparticules de formes fibreuses comme par exemple les nanotubes de carbone ne peuvent être complètement englobées par le macrophage (Schinwald & Donaldson, 2012). Cette phagocytose frustrée s'accompagne de la production d'espèces radicalaires par les macrophages. Par ailleurs, l'efficacité des macrophages vis-à-vis des très petites particules est moindre. En effet, il a été montré chez des rats qui ont inhalé des particules modèles de polystyrène de différentes tailles, que seules 20% des particules de taille nanométrique qui ont été administrées se retrouvent dans les macrophages contre 80% pour des particules micrométriques. Les particules nanométriques sont retrouvées dans l'épithélium et l'interstitium (Oberdörster *et al.*, 2005). Ainsi les nanoparticules étant moins bien phagocytées par les macrophages, elles ont le temps d'interagir avec les cellules épithéliales, de les pénétrer et de les traverser pour passer dans la circulation sanguine.

Les nanoparticules peuvent passer la barrière respiratoire

La capacité des nanoparticules à passer les barrières biologiques est une question essentielle en nanotoxicologie car elle laisse alors entrevoir des effets systémiques dans des organes éloignés du site d'entrée. Des études de biodistribution ont été réalisées par instillations intratrachéales ou inhalation de nanoparticules radiomarquées chez l'animal à de faibles concentrations (Kreyling *et al.*, 2013a). Elles montrent toutes une translocation des nanoparticules, que l'on retrouve dans des organes secondaires comme le foie et la rate. L'essentiel des nanoparticules administrées restant piégé dans le poumon, la translocation reste un phénomène peu fréquent avec un taux de passage de quelques pour cent et les quantités retrouvées dans les organes secondaires sont faibles (Kreyling *et al.*, 2013b). Néanmoins, ces études n'ayant été réalisées qu'après des administrations uniques, il est possible d'envisager pour des nanoparticules biopersistantes, une accumulation à long terme et donc la possibilité d'une toxicité systémique. Dans une autre étude, un large panel de nanoparticules de différentes tailles et charges de surface, fluorescentes dans le proche infrarouge, ont été utilisées pour suivre en temps réel leur devenir après une administration intrabronchique. Ce travail a montré un passage rapide (en 30 mn) dans les nodules lymphatiques pour des nanoparticules ayant

une taille inférieure à 34 nm; en dessous de cette taille seuil, les propriétés de surface des nanoparticules conditionnent leur translocation (Choi *et al.*, 2010).

Dans ce contexte, se développent actuellement des modèles *in vitro* de barrière épithéliale respiratoire (George *et al.*, 2013, 2014; Cohen *et al.*, 2014) avec l'objectif d'identifier les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules qui favorisent leur translocation, ainsi que l'influence du contexte biologique. En effet, avant d'atteindre cette barrière, les nanoparticules vont interagir avec des fluides biologiques, le mucus au niveau des voies aériennes et le surfactant au niveau alvéolaire, qui modifient les propriétés de surface des nanoparticules et donc leur devenir. Les mécanismes impliqués dans le passage des barrières sont loin d'être compris. Pour certaines nanoparticules, leur translocation n'a pu être observée qu'après altération de l'intégrité de l'épithélium par application préalable d'un oxydant responsable de la rupture des systèmes jonctionnels (Geys *et al.*, 2006). Pour d'autres, telles que des nanoparticules de taille inférieure à 22,5 nm, il a été montré qu'elles pouvaient pénétrer l'espace intercellulaire entre cellules endothéliales et ainsi interagir physiquement avec des protéines jonctionnelles telle que la VE-cadhérine. Cette interaction active la signalisation cellulaire, aboutissant à une rétraction cellulaire en lien avec un remodelage du cytosquelette d'actine (Setyawati *et al.*, 2013). Néanmoins, pour d'autres nanoparticules, un passage a été mis en évidence en l'absence d'altération de la perméabilité épithéliale, suggérant que les nanoparticules traversent l'épithélium par la voie transcellulaire et non par la voie paracellulaire (Cohen *et al.*, 2014; George *et al.*, 2014). De nombreux travaux dans la littérature décrivent une internalisation des nanoparticules. Celles-ci sont le plus souvent présentes dans des vésicules mais quelquefois libres dans le cytoplasme sans que l'on sache toujours si c'est à la suite d'une libération des nanoparticules à partir de vésicules dont la membrane se serait rompue ou d'une entrée par diffusion des nanoparticules (Hussain *et al.*, 2009; Belade *et al.*, 2012). Selon les types cellulaires considérés et les nanoparticules étudiées, les voies d'internalisation des nanoparticules peuvent être très variées, allant de la diffusion passive à des mécanismes actifs tels que la phagocytose, la macropinocytose ou l'endocytose dépendante de la clathrine ou de la cavéoline (Kettler *et al.*, 2014).

Quels sont les effets respiratoires ?

Les effets à court terme des nanoparticules ont pu être identifiés par des études d'inhalation chez l'animal de laboratoire, le plus fréquent étant une inflammation pulmonaire caractérisée par un influx de neutrophiles, qui peut être transitoire ou persistante. Cependant ce

potentiel inflammatoire varie selon le type de nanoparticules. Ainsi la toxicité respective d'un large panel de nanoparticules a été comparée chez des rats exposés pendant 5 jours, 6 h /jr à différentes concentrations (0,5 à 50 mg/m³) (Klein *et al.*, 2012; Landsiedel *et al.*, 2014). Des lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés à l'issue de l'exposition ainsi qu'à 28 jours, afin d'identifier des signes d'inflammation tels que le nombre et le type de cellules retrouvées dans les lavages, le niveau de cytokines pro-inflammatoires et des signes d'atteinte de la perméabilité épithéliale. Des lésions épithéliales et inflammatoires dépendantes de la concentration d'exposition ont pu être observées pour les nanoparticules les plus réactives, telles que les nanotubes de carbone multifeuillets et certains types de TiO₂ et de CeO₂. Ces études ont conduit à déterminer une concentration sans effet adverse observé (NOAEL : *no observed adverse effect level*) inférieure à 0,5 mg/m³ pour les nanotubes de carbone, de 0,5 mg/m³ pour le TiO₂ et CeO₂, de 10 mg/m³ pour le SiO₂ nu et le graphène. Par contre le sulfate de baryum, divers types de SiO₂ portant un revêtement de surface ou le dioxyde de zirconium n'induisent pas d'effets dans la gamme des concentrations testées.

Les études de toxicité subchronique et chronique montrent une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales, des lésions fibro-prolifératives et des défauts dans les fonctions des macrophages qui s'accumulent dans les septa interalvéolaires (Shi *et al.*, 2013).

Par ailleurs, il a été montré que les nanoparticules pouvaient avoir des propriétés immunomodulatrices. En effet, des nanoparticules de TiO₂ ou d'or utilisées à des doses faibles, n'induisant pas d'inflammation chez l'animal sain, augmentent l'hyperréactivité bronchique, provoquent des dommages épithéliaux et une inflammation dans un modèle d'asthme professionnel induit chez la souris (Hussain *et al.*, 2011). Des observations similaires ont été faites chez des animaux exposés à des nanoparticules de noir de carbone et pré-sensibilisés à un allergène (Alessandrini *et al.*, 2009). Ces exemples suggèrent une plus grande sensibilité aux nanoparticules des organismes présentant des pathologies.

Quelles caractéristiques physico-chimiques sont importantes ?

Les nanoparticules présentent une diversité de propriétés physico-chimiques (taille, forme, réactivité de surface, charges, composition...) qui peuvent toutes potentiellement contribuer à leur toxicité et il n'est pas possible d'identifier un seul déterminant majeur de la toxicité.

Plus les particules sont petites, plus elles ont un potentiel inflammatoire élevé. En effet, en comparant

une série de nanoparticules peu solubles, il a été observé après instillation intratrachéale, un influx de neutrophiles et une augmentation de la production de médiateurs pro-inflammatoires pour des expositions aux particules de plus faible taille (Duffin *et al.*, 2007). La surface spécifique associée à la faible taille des nanoparticules est un facteur important à prendre en considération dans l'analyse de leurs effets pulmonaires. Ainsi après instillation intratrachéale de nanoparticules de TiO₂ chez le rat ou la souris, les TiO₂ de 20 nm apparaissent plus inflammatoires que celles de 250 nm si on considère la dose administrée en masse mais sont équivalentes si on considère la dose en surface (Oberdörster *et al.*, 2000). L'utilisation de la surface comme référence pour exprimer la dose d'exposition a également été jugée plus adaptée lors de l'étude de plusieurs nanoparticules carbonées (Stoeger *et al.*, 2006).

Le rôle de la forme peut être illustré au travers des travaux qui ont été menés sur les nanotubes de carbone. Leur forme allongée a amené les toxicologistes à s'interroger sur leur capacité à induire des effets similaires à l'amiante. Des nanotubes de carbone, sous forme de pelotes ou de fibres longues et raides, ont été injectés dans la cavité pleurale et leurs effets ont été comparés à des fibres d'amiante courtes ou longues (Murphy *et al.*, 2013). Seuls les nanotubes de carbone longs et raides et les fibres d'amiante longues ont induit une inflammation et un épaississement du mésothélium qui se sont accentués après 7 jours alors qu'ils s'atténaient chez les animaux exposés aux nanotubes de carbone en pelotes. L'hypothèse des auteurs est que, du fait de leur forme, les nanotubes de carbone longs et rigides seraient piégés au niveau des stomates qui devraient normalement permettre leur drainage, ceci favoriserait une inflammation consécutive à la phagocytose frustrée des macrophages (Murphy *et al.*, 2011). Les facteurs de forme et de rigidité associés à la biopersistance des nanotubes apparaissent donc ici comme déterminants dans les développements physio-pathologiques induits par les nanotubes.

La dissolution est un paramètre qui peut aussi influencer la toxicité. Ainsi, pour les nanoparticules très solubles comme celles à base de cuivre, de zinc ou d'argent, leur potentiel inflammatoire est dépendant de la quantité d'ions produits lors de la dissolution dans les phagolysosomes des macrophages qui les ont phagocytées et de la toxicité intrinsèque de ces ions qui vont déstabiliser la membrane du phagolysosome et stimuler l'inflammation (Cho *et al.*, 2012).

Quels sont les mécanismes de toxicité ?

L'induction d'un stress oxydant est considérée comme un mécanisme majeur dans la toxicité des

nanoparticules. Le déséquilibre entre les niveaux intracellulaires d'oxydants et d'anti-oxydants va, selon son intensité, conduire soit à une réponse adaptative de défense anti-oxydante ou bien à une réponse pro-inflammatoire et enfin à la mort cellulaire dans le cas d'oxydation massive des macromolécules cellulaires. Ce stress oxydant peut résulter des capacités intrinsèques des nanoparticules à générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Auffan *et al.*, 2009) par transfert d'électrons, cycle rédox ou par la réaction de Fenton selon la nature des nanoparticules. Différents tests se mettent en place pour caractériser ce potentiel oxydant intrinsèque des nanoparticules. Par exemple la résonance paramagnétique électronique permet, parmi une série d'oxydes métalliques, d'identifier ceux qui sont les plus générateurs de radicaux libres en conditions acellulaires comme l'oxyde de nickel, le dioxyde de cérium, l'oxyde de cobalt (Lu *et al.*, 2009). Cependant l'apparition d'un stress oxydant intracellulaire n'est pas uniquement liée aux capacités intrinsèques des nanoparticules à générer des radicaux. L'interaction des nanoparticules avec les cellules et leur prise en charge peut s'accompagner d'une activation cellulaire génératrice d'ERO intracellulaires ou d'une déplétion des molécules anti-oxydantes (Marano *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2014). Une étude comparant des nanoparticules de TiO₂ et de noir de carbone a ainsi montré qu'elles induisaient la mort cellulaire par apoptose de cellules épithéliales bronchiques humaines par un mécanisme dépendant de la production d'ERO. Cependant les nanoparticules de noir de carbone ont la capacité de diminuer les défenses anti-oxydantes conduisant à un stress oxydant qui affecte la mitochondrie alors que les nanoparticules de TiO₂ déstabilisent les lysosomes par induction d'une peroxydation lipidique (Hussain *et al.*, 2010). Ce stress oxydant contribue à l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'induction de la réponse pro-inflammatoire telles que l'activation des MAP kinases et du facteur de transcription NF- κ B (Manke *et al.*, 2013). Néanmoins selon la nature des espèces activées de l'oxygène produites, il peut aussi provoquer des lésions du matériel génétique et ainsi contribuer à plus long terme au développement de tumeurs. La génotoxicité des nanoparticules n'est pas uniquement liée au stress oxydant mais peut découler de la libération d'ions à partir des nanoparticules, de perturbations des fonctions de contrôle du cycle cellulaire ou encore d'interactions directes des nanoparticules avec l'ADN ou des composants du fuseau mitotique (Kumar & Dhawan, 2013).

D'autres mécanismes que le stress oxydant peuvent être impliqués dans la toxicité des nanoparticules dont certains sont à relier à la capacité de ces nanoparticules à interagir avec les protéines. Dans la corona qui se forme à la surface des nanoparticules, les protéines

présentent des modifications structurales qui peuvent entraîner des pertes ou des modulations de fonctions (Saptarshi *et al.*, 2013). Ainsi il a été démontré que des nanoparticules d'or recouvertes d'acide polyacrylique fixent du fibrinogène, protéine plasmatique, et que cette fixation est associée à un démasquage d'un épitope cryptique (Deng *et al.*, 2011). Cet épitope permet alors au complexe nanoparticule-fibrinogène d'activer des macrophages portant le récepteur spécifique activé par cet épitope et d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires.

Par ailleurs, d'autres études ont montré l'impact de nanoparticules sur l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Ainsi diverses nanoparticules fixent ou altèrent la conformation et inhibent de façon irréversible l'activité d'une arylamine N-acétyltransférase, enzyme impliquée dans le métabolisme des amines aromatiques (Sanfins *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2014). Ces observations obtenues en conditions acellulaires ont été confirmées sur des cellules bronchiques qui, lorsqu'elles sont exposées à des nanoparticules de noir de carbone, présentent une activité métabolique réduite proportionnelle à la concentration d'exposition (Sanfins *et al.*, 2011). Cet exemple illustre les capacités des nanoparticules à interférer avec des voies métaboliques comme celles impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques; les conséquences peuvent en être dommageables lors d'une exposition simultanée à des toxiques.

Conclusions

La voie respiratoire constitue une voie importante d'exposition non intentionnelle aux nanoparticules manufacturées aussi bien dans un contexte environnemental que professionnel. Les mécanismes de protection dont est doté l'appareil respiratoire ne suffisent pas à éliminer efficacement les nanoparticules inhalées qui vont se déposer profondément jusqu'au niveau des alvéoles pulmonaires. L'interaction des nanoparticules avec les tissus respiratoires va permettre non seulement leur passage au travers de la barrière respiratoire pour gagner la circulation sanguine mais aussi le développement d'une inflammation pulmonaire, phénomènes dans lesquels les propriétés physico-chimiques des nanoparticules sont déterminantes. La taille, la forme, les propriétés de surface, la dissolution sont autant de paramètres qui y contribuent sans que l'on soit à même d'évaluer leur contribution respective. Le stress oxydant relié aux propriétés oxydantes intrinsèques des nanoparticules ou à leur capacité à activer des processus cellulaires générateurs d'espèces oxydantes permet dans un certain nombre de cas d'expliquer la toxicité des nanoparticules. Cependant d'autres mécanismes de toxicité

sont à envisager en lien avec la capacité des nanoparticules à interagir avec des protéines dont ils peuvent moduler la structure et/ou la fonction et ainsi modifier le devenir et les effets des nanoparticules. Les connaissances sur le danger des nanoparticules sont à approfondir non seulement pour une meilleure évaluation du risque des nanomatériaux mais aussi pour fournir des éléments objectifs sur les caractéristiques des nanoparticules potentiellement modifiables afin de diminuer leur toxicité.

Références

- Alessandrini F., Beck-Speier I., Krappmann D., Weichenmeier I., Takenaka S., Karg E., Kloo B., Schulz H., Jakob T., Mempel M., Behrendt H., Role of oxidative stress in ultrafine particle-induced exacerbation of allergic lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179, 984–991.
- Andujar P., Lanone S., Brochard P., Boczkowski J., Respiratory effects of manufactured nanoparticles. *Rev Mal Respir*, 2011, 28, e66–75.
- Auffan M., Rose J., Bottero J.Y., Lowry G.V., Jolivet J.P., Wiesner M.R., Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4, 634–641.
- Baeza A., Marano F., Pollution atmosphérique et maladies respiratoires : Un rôle central pour le stress oxydant. *Med Sci (Paris)*, 2007, 23, 497–501.
- Baeza-Squiban A., Lanone S., Exposure, Uptake, and Barriers. In: “*Nanotoxicology and Nanoethics*”, Lahmani M., Marano F., Houdy P., (Eds.), 2011, Belin, Paris, pp. 53–78.
- Belade E., Armand L., Martinon L., Kheuang L., Fleury-Feith J., Baeza-Squiban A., Lanone S., Billon-Galland M.A., Pairon J.C., Boczkowski J., A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26, 57–66.
- Braakhuis H.M., Park M.V., Gosens I., De Jong W.H., Cassee F.R., Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11, 18.
- Cho W.S., Duffin R., Thielbeer F., Bradley M., Megson I.L., Macnee W., Poland C.A., Tran C.L., Donaldson K., Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicol Sci*, 2012, 126, 469–477.
- Choi H.S., Ashitate Y., Lee J.H., Kim S.H., Matsui A., Insin N., Bawendi M.G., Semmler-Behnke M., Frangioni J.V., Tsuda A., Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol*, 2010, 28, 1300–1303.
- Cohen J.M., Derk R., Wang L., Godleski J., Kobzik L., Brain J., Demokritou P., Tracking translocation of industrially relevant engineered nanomaterials (ENMs) across alveolar epithelial monolayers *in vitro*. *Nanotoxicology*, 2014, 8, 216–225.
- Deng Z.J., Liang M., Monteiro M., Toth I., Minchin R.F., Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6, 39–44.
- Deng Z.J., Butcher N.J., Mortimer G.M., Jia Z., Monteiro M.J., Martin D.J., Minchin R.F., Interaction of human arylamine N-acetyltransferase 1 with different nanomaterials. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42, 377–383.
- Duffin R., Tran L., Brown D., Stone V., Donaldson K., Proinflammatory effects of low-toxicity and metal nanoparticles *in vivo* and *in vitro*: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhal Toxicol*, 2007, 19, 849–856.
- George I., Vranic A., Boland S., Borot M., Marano F., Baeza-Squiban A., Translocation of SiO₂-NPs across *in vitro* human bronchial epithelial monolayer. *J Phys Conf Ser*, 2013, 429, 012022.
- George I., Vranic A., Courtois A., Boland S., Baeza-Squiban A., Development of an *in vitro* model of human bronchial epithelial barrier to study nanoparticle translocation. *Toxicol In Vitro*, en révision
- Geys J., Coenegrachts L., Vercammen J., Engelborghs Y., Nemmar A., Nemery B., Hoet P.H., *In vitro* study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study. *Toxicol Lett*, 2006, 160, 218–226.
- Hansen S.F., Larsen B.H., Olsen S.I., Baun A., Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology*, 2007, 1, 243–250.
- Hussain S., Boland S., Baeza-Squiban A., Hamel R., Thomassen L.C., Martens J.A., Billon-Galland M.A., Fleury-Feith J., Moisan F., Pairon J.C., Marano F., Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 2009, 260, 142–149.
- Hussain S., Thomassen L.C., Ferecatu I., Borot M.C., Andreau K., Martens J.A., Fleury J., Baeza-Squiban A., Marano F., Boland S., Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*, 2010, 7, 10.
- Hussain S., Vanoirbeek J.A., Luyts K., De Vooght V., Verbeke E., Thomassen L.C., Martens J.A., Dinsdale D., Boland S., Marano F., Nemery B., Hoet P.H., Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J*, 2011, 37, 299–309.
- Hussain S., Garantziotis S., Rodrigues-Lima F., Dupret J.M., Baeza-Squiban A., Boland S., Intracellular signal modulation by nanomaterials. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 811, 111–134.
- Kettler K., Veltman K., van de Meent D., van Wezel A., Hendriks A.J., Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ Toxicol Chem*, 2014, 33, 481–492.

- Klein C.L., Wiench K., Wiemann M., Ma-Hock L., van Ravenzwaay B., Landsiedel R., Hazard identification of inhaled nanomaterials: making use of short-term inhalation studies. *Arch Toxicol*, 2012, 86, 1137–1151.
- Kreyling W.G., Semmler-Behnke M., Takenaka S., Möller W., Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Acc Chem Res*, 2013, 46, 714–722.
- Kreyling W.G., Hirn S., Möller W., Schleh C., Wenk A., Celik G., Lipka J., Schäffler M., Haberl N., Johnston B.D., Sperling R., Schmid G., Simon U., Parak W.J., Semmler-Behnke M., Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS Nano*, 2014, 8, 222–233.
- Kumar A., Dhawan A., Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Arch Toxicol*, 2013, 87, 1883–1900.
- Landsiedel R., Ma-Hock L., Hofmann T., Wiemann M., Strauss V., Treumann S., Wohlleben W., Gröters S., Wiench K., van Ravenzwaay B., Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11, 16.
- Lu S., Duffin R., Poland C., Daly P., Murphy F., Drost E., Macnee W., Stone V., Donaldson K., Efficacy of simple short-term *in vitro* assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. *Environ Health Perspect*, 2009, 117, 241–247.
- Manke A1, Wang L., Rojanasakul Y., Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int*, 2013, 2013, 942–916.
- Marano F., Hussain S., Rodrigues-Lima F., Baeza-Squiban A., Boland S., Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol*, 2011, 85, 733–741.
- Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A., Dawson K.A., Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7, 779–786.
- Murphy F.A., Poland C.A., Duffin R., Al-Jamal K.T., Ali-Boucetta H., Nunes A., Byrne F., Prina-Mello A., Volkov Y., Li S., Mather S.J., Bianco A., Prato M., Macnee W., Wallace W.A., Kostarelos K., Donaldson K., Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *Am J Pathol*, 2011, 178, 2587–2600.
- Murphy F.A., Poland C.A., Duffin R., Donaldson K., Length-dependent pleural inflammation and parietal pleural responses after deposition of carbon nanotubes in the pulmonary airspaces of mice. *Nanotoxicology*, 2013, 7, 1157–1167.
- Oberdörster G., Finkelstein J.N., Johnston C., Gelein R., Cox C., Baggs R., Elder A.C., Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*, 2000, 96, 5–74.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J., Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, 113, 823–839.
- Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J., Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10, 15.
- Saptarshi S.R., Duschl A., Lopata A.L., Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnol*, 2013, 11, 26.
- Sanfins E., Dairou J., Hussain S., Busi F., Chaffotte A.F., Rodrigues-Lima F., Dupret J.M., Carbon black nanoparticles impair acetylation of aromatic amine carcinogens through inactivation of arylamine N-acetyltransferase enzymes. *ACS Nano*, 2011, 5, 4504–4511.
- Schinwald A., Donaldson K., Use of back-scatter electron signals to visualise cell/nanowires interactions *in vitro* and *in vivo*; frustrated phagocytosis of long fibres in macrophages and compartmentalisation in mesothelial cells *in vivo*. *Part Fibre Toxicol*, 2012, 9, 34.
- Setyawati M.I., Tay C.Y., Chia S.L., Goh S.L., Fang W., Neo M.J., Chong H.C., Tan S.M., Loo S.C., Ng K.W., Xie J.P., Ong C.N., Tan N.S., Leong D.T., Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin. *Nat Commun*, 2013, 4, 1673.
- Stoeger T., Reinhard C., Takenaka S., Schroepel A., Karg E., Ritter B., Heyder J., Schulz H., Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect*, 2006, 114, 328–333.
- Witschger O., Fabriès J.F., Particules ultra-fines et santé au travail: 1- Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. Hygiène et sécurité du travail. *Cahiers de notes documentaires, ND2227*, 2005, 199, 21–35.