

Université de Montréal

**Étude du potentiel cytotoxique des nanotubes de carbone
simple-paroi chez les cellules épithéliales alvéolaires
humaines A549**

par

Zeinab Ali Abbas

Département de pharmacologie, Université De Montréal
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc)
en pharmacologie

août, 2015

© Zeinab Ali Abbas, 2015

Résumé

Il existe un grand intérêt pour le développement et les applications des nanotubes de carbone (NTC) car ils ont un énorme potentiel dans diverses applications industrielles. Cependant, leur dimension nanométrique et leur composition chimique peuvent constituer un risque sur la santé humaine. Les mécanismes responsables de la toxicité des NTC restent encore à définir. L'objectif de ce projet était de déterminer la toxicité potentielle de deux types de nanotubes de carbone simple-paroi (NTCSP): RN 000 et RN 003 chez une lignée cellulaire de pneumocytes de type II, les cellules A549. Méthodologie: Les essais MTS et PrestoBlue®, le test d'exclusion au bleu de trypan, la coloration HT-IP et l'*Apoptotic Blebs* ont été utilisés pour déterminer la toxicité potentielle de ces NTCSP. Résultats: Suite à une exposition de courte durée (24h), l'essai MTS a montré une diminution de la viabilité cellulaire significative de 20% pour [NTCSP] à 50 et 100 µg/ml et 74% pour [NTCSP] à 1000 µg/mL. Le PrestoBlue® a indiqué une mortalité cellulaire d'environ 45% et de 85% pour des concentration de 500 et 1000 µg/ml de NTCSP. Cependant, les données de l'essai d'exclusion du bleu de trypan ont montré que les NTCSP n'altèrent pas la viabilité cellulaire. L'absence d'une altération de la viabilité cellulaire a été confirmée avec la coloration HT-IP et l'*Apoptotic Blebs*. Cependant, l'interaction des NTCSP avec les cellules A549 a induit un changement de la morphologie cellulaire ; une diminution de la taille ainsi une augmentation de la structure interne des cellules A549. À une exposition à longue durée (72h), les données ont confirmé les résultats d'exposition à 24h. En effet, il n'y a de pas de mortalité cellulaire, mais une diminution de la prolifération cellulaire. En conclusion, notre étude indique que le RN 000 et le RN 003 interagissent avec les cellules A549 sans altérer leur viabilité, mais en induisant une dysfonction mitochondriale qui pourrait avoir plusieurs conséquences sur la fonction cellulaire.

Mots-clés: A549, nanotube de carbone simple-paroi, prolifération cellulaire, toxicité, viabilité cellulaire, dysfonction mitochondriale

Abstract

There is great interest in the development and application of carbon nanotubes (CNT) as they have a huge potential for various industrial applications. However, their nanometric size and chemical composition can be a risk to human health. The mechanisms responsible for the toxicity of CNT are still being defined. The objective of this project was to determine the potential toxicity of two types of single-walled carbon nanotubes (SWCNT): RN 000 and RN 003 on a cell line of type II pneumocytes, A549 cells. Methodology: MTS and PrestoBlue® tests, trypan blue exclusion test, HT-PI staining and Apoptotic blebs were used to determine the potential toxicity of these SWCNT. Results: Following a short exposure (24h), MTS test showed a significant decrease, by 20%, in cell viability [SWCNT] among 50 and 100 µg/mL, and 74% decrease for 1000 µg/mL of [SWCNT]. Moreover, the PrestoBlue® test indicated cell mortality of 45% and 85% for SWCNT concentrations of 500 and 1000 µg/mL respectively. However, data of the trypan blue exclusion test showed that SWCNT does not adversely affect cell viability. The absence of an alteration of the cell viability was confirmed with the HT-PI staining and Apoptotic blebs. Hence, there appeared to be evidence that interaction of SWCNT with A549 cells induces a change in cellular morphology, particularly a size reduction and an increase of the internal structure of A549 cells. In a long-term exposure (72h), the data was consistent with the results of a 24h exposure. Indeed, SWCNT do not cause cell mortality, but do significantly decrease cell proliferation. In conclusion, our study indicated that the RN 000 and RN 003 interact with A549 cells without affecting their viability but by inducing mitochondrial dysfunction that may have several consequences on cell function.

Keywords: A549, cell proliferation, cell viability, single-walled carbon nanotubes, toxicity, mitochondrial dysfunction

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Liste des figures	v
Liste des sigles	vi
Liste des abréviations	vii
Remerciements	ix
Introduction	1
1. Nanotechnologies.....	1
1.1 Histoire.....	1
1.2 Étymologie du mot «nano».....	1
1.3 Définition et intérêt.....	2
1.4 Nanomatériaux.....	2
1.5 Nanoparticules naturelles et nanoparticules manufacturées	3
2. Nanotubes de carbone.....	4
2.1 Définition	4
2.3 Structure et différents types de nanotubes de carbone.....	4
2.4 Synthèse des nanotubes de carbone	5
2.5 Propriétés et applications	7
3. Risques sur la santé humaine et l'environnement.....	9
3.1 Effets sur l'homme (producteurs et utilisateurs).....	9
3.2 Voies d'exposition	9
3.3 Effets sur l'environnement.....	11
4. Études de nanotoxicologie	11
4.1 Études <i>in vitro</i>	11
4.3 Études <i>in vivo</i>	13
4.4 Études épidémiologiques	16
5. Objectif et démarche de l'étude	17
Matériel et méthodes	18
1. Nanoparticules	18

2. Dispersion des NTC	18
3. Culture cellulaire.....	18
4. Exposition des cellules aux NTC et PQ.....	19
5. Détermination de la viabilité cellulaire.....	19
6. Test MTS	20
7. Test de PrestoBlue®	20
8. Test d'exclusion au bleu de trypan	21
9. Détermination de la mort cellulaire	21
10. Coloration HT-IP	22
11. Mesure des corps apoptotiques	22
12. Analyses statistiques	23
Résultats	24
1. Évaluation de la viabilité cellulaire par le test MTS lors de l'exposition à deux NTCSP	24
2. Évaluation de la viabilité cellulaire par le test PrestoBlue® lors de l'exposition de deux NTCSP	27
3. Effet des NTCSP sur la viabilité cellulaire des cellules A549 déterminé par le test d'exclusion au bleu de trypan :	29
4. Étude de l'altération de la viabilité cellulaire par la coloration HT-IP.....	30
5. Étude de l'altération de la viabilité cellulaire par la mesure des corps apoptotiques (<i>Apoptotic blebs</i>).....	33
6. Étude de la prolifération cellulaire par le test d'exclusion au bleu de trypan lors de l'exposition de différentes durées aux NTCSP	37
Discussion	39
Conclusion et perspectives	45
Bibliographie	48

Liste des figures

Figure 1. Interférence et la viabilité cellulaire évaluée par l'essai MTS pendant 24h.....	26
Figure 2. Interférence et viabilité cellulaire évaluées par l'essai PrestoBlue® pendant une exposition de 24h aux NTCSP.....	28
Figure 3. Viabilité cellulaire évaluée par le comptage des cellules bleues colorées au bleu de trypan.	29
Figure 4. Coloration HT-IP des cellules A549 pour la mise en évidence du type de mortalité cellulaire après une exposition aux NTCSP pendant 24h.	32
Figure 5. Effets des NTCSP RN 000 et RN 003 sur l'apoptose des cellules A549.....	34
Figure 6. La morphologie des cellules A549 à l'aide de la protéine de fusion scFv liée à la protéine A comme suite à l'exposition aux NTCSP.	36
Figure 7. Cinétique de la viabilité cellulaire des A549 exposées aux NTCSP.	38

Liste des sigles

A:	ampère
atm:	atmosphère normale
cm ² :	centimètre carrée
h:	heure
m:	mètre
mg:	milligramme
mL:	millilitre
mM:	millimolaire
U:	unité
µg:	microgramme
µL:	microlitre
λ :	longueur d'onde

Liste des abréviations

A549 :	Lignée de cellules épithéliales alvéolaires issues d'un adénocarcinome humain
ADN :	acide désoxyribonucléique
ANOVA :	<i>analysis of variance</i> (analyse de la variance)
ATP :	adénosine triphosphate
BEAS-2B :	lignée transformée de cellules épithéliales bronchiques humaines
BSA :	<i>bovine serum albumin</i>
CdS :	cadmium sulfide
CdSe :	séléniure de cadmium
Co :	cobalt
CO :	monoxyde de carbone
CoMoCAT®:	<i>Cobalt–Molybdenum catalyst</i>
CO ₂ :	dioxyde de carbone
DCV :	dépôt chimique en phase vapeur
E.T.M :	erreur type de mesure
FBS :	<i>fetal bovine serum</i>
GM-CSF :	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HEK :	lignée de cellules de kératinocytes épidermiques humaines
HiPco® :	<i>High-Pressure carbon monoxide</i>
HT :	Hoechst
IL-8 :	interleukine-8
IP :	iodure de propidium
ISO:	Organisation internationale de normalisation
LBA :	lavage bronchoalvéolaire
MIF :	intensité de fluorescence
Mo :	molybdène
MOY :	moyenne

MTS :	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
N9 :	lignée de cellules microgliales murines
NP :	nanoparticule
NR8383 :	lignée de cellules de macrophages alvéolaires des rats
NTC :	nanotube de carbone multi-parois
NTCMP :	nanotube de carbone multi-parois
NTCSP :	nanotube de carbone simple-paroi
PMS :	phénazine méthosulfate
PQ :	point quantique
qRT-PCR :	<i>quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
ROS :	<i>Reactive Oxygen Species</i>
scFv :	<i>single-chain variable fragment</i>
TiO ₂ :	dioxyde de titane
ZnO :	oxyde de zinc

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le vice-doyen aux cycles supérieurs de la faculté de médecine, Pr Daniel Lajeunesse, pour avoir approuvé la recommandation du comité des études supérieures du département de pharmacologie. Je tiens à remercier les membres du comité pour avoir cru en moi et me donner la chance de poursuivre mes études: Dr Audrey Claing, Dr Sylvain Meloche, Dr Louis-Éric Trudeau et pour finir Dr René Cardinal. Je tiens fortement à remercier Dr Cardinal, car il m'a fait un suivi tout au long de ma maîtrise et surtout vers la fin. C'est une personne à qui je dois un grand respect pour m'avoir donné l'opportunité d'apprendre davantage à communiquer, à exprimer mes idées, à chercher et à développer un esprit critique. Merci pour votre soutien. Je remercie également le membre de jury qui ont accepté d'évaluer ce mémoire Dr Rousseau et Dr Claing.

Je remercie mon directeur de recherche, Dr Karim Maghni, pour m'avoir donné la chance en m'acceptant dans son laboratoire comme stagiaire pendant mon baccalauréat et ensuite pour avoir cru en moi et me recommander comme étudiante à la maîtrise. Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire mes preuves. Merci pour votre soutien.

Je prends le temps de remercier notre Mélanie Welman. Elle a été, pour moi, plus qu'une assistante de recherche. Dès que je l'ai vu lors de mon entrevue, elle m'a donné courage et une bonne estime de moi. Tout au long de mon stage et ma maîtrise, elle m'a beaucoup aidée au niveau de la manipulation, merci beaucoup pour ta patience. Merci pour tous les fous rires au labo et dans métro. Merci pour ton écoute et de m'avoir donné tous les conseils qu'il faut. Merci de m'avoir toujours encouragée tout en étant honnête avec moi. J'ai beaucoup à dire, mais ceci ne vais jamais finir. Merci d'être simplement là pour moi et comme je te le dis toujours et je le répète mille mercis !!!

Je tiens à remercier Lyes Tabet, la personne qui m'a fait découvrir le monde NANO et merci pour tes conseils et ta patience pour la manipulation au laboratoire. Je remercie la compagnie Raymor Nanotech, ainsi que la fondation de l'HSCM (fond Auger) pour ma bourse de maîtrise.

Je remercie ma partenaire de laboratoire et mon amie Rajaa Tabbaa Chalabi. Je sais

que tu n'aimes pas quand je te dis le mot merci, car ça te fait toujours plaisir de m'aider, de m'écouter et d'être là pour moi pendant ma maîtrise, mais permet moi juste ici. On a commencé ensemble le bac, mais le stage et surtout nos années de maîtrise nous ont permis de se connaître de plus en plus. Merci de m'avoir fait partager tes histoires qui commencent toujours par OMG ! Devine quoi ?! Merci beaucoup pour ton aide durant mes cours de maîtrise et au labo. Merci pour tout.

Je remercie ma gang de Sacré-Cœur : Bouchra, Houda (merci aussi de m'aider pendant les cours de maîtrise), Pierre et sa vitamine K, Marie-Claude, Gervais, incluant bien sûr la chef de la gang Mélanie pour nos moments inoubliables ensemble et surtout pendant le dîner. Je tiens à remercier mes voisins à côté de notre bureau : Guillaume (Merci pour ton sens de l'humour), Chantale (Merci pour toujours me donner des compliments), Annick (Merci de m'avoir donné l'opportunité de participer à ton étude). Je remercie également notre technicienne du centre de recherche Ginette.

Une pensée à mes amies à vie Rania et Meriem et à mes cousines pour m'avoir encourager et me motiver tout au long de ma maîtrise.

Finalement, je prends le temps de remercier ma famille et les personnes de mon entourage. Merci à maman pour être là dans ma vie. Merci pour ton support et ta motivation pour que je continue mes études. Merci pour tous les conseils de la vie. Merci à papa. Merci pour tous vos sacrifices. Merci à ma sœur Ayah et mes deux frères: Ali et Sadek.

Introduction

1. Nanotechnologies

1.1 Histoire

Le 29 décembre 1959, le Dr Richard Phillips Feynman donna une conférence devant l'American Physical Society qui portait le titre suivant : « There is plenty of room at the bottom » (Il y a beaucoup d'espace en bas) [Feynman, 1960]. Ce physicien américain (Prix Nobel de physique en 1965), déclara lors de ce discours que « les principes de la physique, pour autant que nous puissions en juger, ne s'opposent pas à la possibilité de manipuler des choses atome par atome » [Feynman, 1960]. Il a donc suggéré à la communauté scientifique d'explorer l'univers de l'infiniment petit « le nanomonde ». Cette conférence fut célèbre et celui-ci est aujourd'hui considéré comme le fondateur de la nanotechnologie. Suite à cette déclaration, le terme « nanotechnologie » fut employé pour la première fois par le Dr Norio Taniguchi (chercheur à l'Université de Tokyo) lors de la conférence internationale sur la production en ingénierie en 1974 [Webster, 2007]. Cependant, c'est grâce à l'invention du microscope à effet tunnel en 1981 par les chercheurs d'IBM à Zurich, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer (Prix Nobel, 1986), qu'il y a eu l'observation et la création d'objets à l'échelle nanométrique [Kim, 2008]. Cet instrument permet l'imagerie des surfaces à l'échelle atomique en se basant sur le phénomène quantique connu sous le nom de « l'effet tunnel » [Kim, 2008]. Par la suite, plusieurs pays industrialisés ont été séduits par cette discipline où la tendance est à la miniaturisation.

1.2 Étymologie du mot «nano»

Le préfixe « nano » doit son origine au mot grec ancien *νανος* (en latin *nanos*) et signifie nain. Il représente un milliardième de l'unité de base (10^{-9}).

1.3 Définition et intérêt

Les nanotechnologies constituent un champ de recherche et de développement multidisciplinaire impliquant la fabrication de nouveaux matériaux et de nouveaux dispositifs aux propriétés physiques et chimiques exceptionnelles, à partir d'outils ou de techniques permettant de structurer la matière à l'échelle du nanomètre (nm). Ces nouvelles technologies sont présentées aujourd'hui comme étant le futur de divers domaines et de disciplines scientifiques, tel que la physique, la chimie, la médecine, etc. Comme preuve, citons les investissements consentis afin de développer les nanotechnologies. Or, au même titre que l'automobile au début du 20^{ème} siècle, l'impact des nanotechnologies sur l'économie est très prometteur et pourrait être la prochaine révolution industrielle. Plusieurs organismes dont la *Commission Européenne* et la *National Science Foundation* estiment que le marché mondial annuel sera de l'ordre de 3 000 milliards de dollars américains vers 2015 [Auplat & Delemarle, 2013]. Ainsi, cela pourrait conduire à la création de 2 millions d'emplois à l'échelle mondiale [Auplat & Delemarle, 2013]. En effet, d'après un rapport de la *National Science Foundation*, environ 6 millions de travailleurs seront impliqués dans l'industrie de la nanotechnologie en 2020 dont 2 millions aux États-Unis [Manke et al., 2013]. Selon le rapport de la société de conseil Lux Research Inc., les États-Unis, le Japon, l'Allemagne et la Corée du Sud sont les pays les plus investisseurs dans les nanotechnologies [Auplat & Delemarle, 2013]. NanoQuébec rapporte que 573 industries ont été recensées aux États-Unis et 51 au Canada [Fatisson et al., 2013].

1.4 Nanomatériaux

Les nanotechnologies sont constituées de nanomatériaux qui eux sont composés de nanoparticules. Ces nanoparticules sont définies comme étant des particules ayant au moins une dimension dans l'espace de l'ordre 1 à 100 nanomètres ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). En effet, selon le rapport du Conseil des Consommateurs du Canada, les nanomatériaux sont des matériaux avec une, deux ou trois dimensions à l'échelle du nanomètre (1 à 100 nanomètres) qui ont des propriétés différentes de celles du même matériau sous sa forme brute. Ils peuvent avoir une seule dimension à l'échelle nanométrique (ex. nanoplaques), deux dimensions (ex. nanofibres)

ou trois dimensions (ex. nanoparticules) [Sutariya & Pathak, 2014]. Le terme nanoparticule, utilisé en général pour regrouper l'ensemble de ces éléments, a été proposé et adopté par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) [Sutariya & Pathak, 2014].

1.5 Nanoparticules naturelles et nanoparticules manufacturées

Depuis longtemps, l'être humain est exposé aux nanoparticules dans notre environnement puisqu'ils existent déjà à l'état naturel. Cependant, cette exposition s'est accrue depuis les progrès au niveau technologique et de la révolution industrielle. Or, les nanoparticules sont classées en trois types en fonction de leur source [Simon-Deckers, 2008]:

- 1) les NP d'origine naturelle résultant principalement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère. En effet, certaines particules ayant une taille nanométrique sont d'origine biologique telles que de nombreux virus (environ 20 à 300 nm), l'ADN (diamètre de 2,5 nm), les bactéries, etc. Il y a aussi des particules d'origine minérale ou environnementale, par exemple, le smog, la fraction fine du sable de désert, des particules issues des éruptions volcaniques, des feux de forêt, etc.
- 2) les NP d'origine anthropogénique non intentionnelle issues des procédés chauds tels que les fumées de métaux, polymères, cigarettes, etc.
- 3) les NP d'origine anthropogénique intentionnelle ou NP manufacturées. Dans un but industriel ou recherche, on y retrouve des nanoparticules manufacturées telles que les points quantiques (PQ) dont la longueur d'onde de la lumière émise par ceci dépend de sa taille. Dans les crèmes solaires et produits cosmétiques, il y a des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO_2), et d'oxyde de zinc (ZnO). Les nanotubes de carbones sont aussi des nanoparticules manufacturées différentes, mais très importants dans la nanotechnologie. De plus, depuis que le scientifique japonais S. Iijima a mis en avant, en 1991, la découverte des nanotubes de carbone [Iijima, 1991], plusieurs industries et

laboratoires de recherche s'intéressent de près aux propriétés uniques de ces nanoparticules manufacturées.

2. Nanotubes de carbone

2.1 Définition

À l'état solide, le carbone est retrouvé sous différentes formes allotropiques. Ces formes présentées naturellement sont : le carbone amorphe et trois formes cristallisées. Le graphite est un cristal hexagonal bidimensionnel dont l'hybridation des orbitales atomiques est sp^2 . Le diamant est aussi une forme cristalline mais tridimensionnelle dont l'hybridation est sp^3 . En 1985, R. Smalley, R. Curl et H. Kroto ont découvert une nouvelle forme à zéro dimension, la molécule C_{60} , qui fait partie de la famille des fullerènes [Mostofizadeh et al., 2011]. Elle est constituée de 60 atomes de carbone disposés aux sommets d'un polyèdre régulier. Les fullerènes sont des molécules composées d'un feuillet d'atomes de carbone, liés entre eux sous forme d'anneaux hexagonaux, pentagonaux ou heptagonaux; ainsi ils peuvent alors prendre la forme de sphères, d'ellipsoïdes et de tubes [Pras, 2013]. Depuis cette découverte, plusieurs autres formes allotropiques synthétiques ont été observées comme les feuillets de graphène ou nanotubes.

Un nanotube de carbone est composé d'un feuillet de graphène enroulé sur lui-même. La longueur est de quelques nanomètres à plusieurs micromètres alors que le rayon de courbure est uniquement nanométrique.

2.3 Structure et différents types de nanotubes de carbone

Il existe deux types de NTC: Les NTC simple-paroi (NTCSP) et les NTC multi-parois (NTCMP). C'est en synthétisant des fullerènes que Sumio Iijima a observé en 1991, en microscope électronique, un dépôt noirâtre, dur et filamenteux. Ils ont pu constater que ce sont des tubes de carbone multifeuillets présentant un diamètre nanométrique. En 1993, S. Iijima et D. Bethune ont pu réaliser les mêmes observations et découvrir des nanotubes de carbone monofeuillets [Bethune et al., 1993]. Comme le nom l'indique, les NTCSP sont représentés

d'un feuillet de graphène enroulé sur lui-même de façon à former un cylindre, tandis que les NTCMP sont formés de plusieurs feuillets de graphène (2 à 50) enroulés les uns autour des autres. Les NTCMP peuvent être sous deux formes différentes basées soit sur un emboîtement de feuillets de graphène classés en cylindres concentriques dit en « poupées russes », ou sur l'enroulement de multiples reprises d'un unique feuillet et de graphène en spirale dit en « parchemin » [Ricaud et al., 2008]. En fonction du nombre de couches, le diamètre intérieur de NTCMP varie de 0,4 nm jusqu'à quelques nanomètres, le diamètre extérieur varie de 2 à 20 nm jusqu'à 30 nm, et la taille axiale varie de 1 µm jusqu'à quelques centimètres [Eatemadi et al., 2014]. En revanche, les diamètres des NTCSP varient de 0,4 à 2 à 3 nm et leur longueur est typiquement de l'ordre du micromètre [Eatemadi et al., 2014]. Les NTCSP peuvent s'assembler et former des faisceaux [Eatemadi et al., 2014]. Dans une structure en faisceau, les NTCSP sont des hexagones organisés pour prendre une forme en cristal.

2.4 Synthèse des nanotubes de carbone

On retrouve différentes techniques pour la synthèse des NTC impliquant surtout des procédés en phase gazeuse. Ces voies de synthèses sont classées en deux grandes familles: les voies physiques ou voies de synthèse à haute température et les voies chimiques ou voies de synthèse à température moyenne [Ricaud et al., 2008]. La voie de synthèse à haute température consiste à sublimer le carbone graphite et à le condenser sous forme de nanotubes dans une enceinte mise sous atmosphère inerte à une température élevée (environ à 3200 °C) [Rafique et al., 2011]. Il existe trois méthodes basées sur le principe de cette voie : arc électrique, ablation laser et réacteur solaire. Tout d'abord, grâce à l'arc électrique, la plus ancienne méthode, les NTC ont pu être découverts par S. Iijima. Ce procédé comprend deux électrodes de graphite : le carbone se vaporise à l'anode et se condense à la cathode. Les nanotubes sont obtenus dans un dépôt de suie sur l'une des électrodes suites à une décharge d'un arc électrique entre ces deux électrodes de graphite. Par la suite, en 1995, l'ablation laser a été une autre technique conçue par le groupe de R. Smalley à l'Université de Houston [Scott et al., 2001]. Celle-ci consiste à bombarder une cible de graphite dans un réacteur à haute température en présence d'un gaz inerte tel que l'hélium, ce qui entraîne une vaporisation de la

cible de graphite. Ensuite, quand le graphite se condense, les nanotubes se développent sur les surfaces du réacteur. Le réacteur solaire est basé sur l'énergie solaire pour la sublimation du graphite. Cependant ces trois procédés à haute température possèdent des inconvénients permettant de limiter leur utilisation dans les industries pour fabriquer des grandes quantités de NTC [Rafique et al., 2011]. En effet, leur utilisation de grande quantité d'énergie n'est pas praticable ni rentable pour la production à grande échelle. De plus, l'obtention d'une grande quantité de graphite rend difficile à extrapoler cette méthode à un niveau industriel. Les NTC produits par ces méthodes ne sont pas purifiés, car ils sont mélangés avec la forme indésirable de carbone et de catalyseurs, ce qui demande une autre étape de purification. Or, cette dernière étape peut demander des procédés de purification difficile et coûteux.

Le second type de voie de synthèse basée sur température moyenne comprend aussi trois différentes méthodes : le dépôt chimique en phase vapeur (DCV) [Che et al., 1998], la réaction de haute pression de monoxyde de carbone (HiPco®) [Nikolaev, 2004] et le processus CoMoCAT® [Wang et al. 2014]. En 1996, le DCV s'est avéré comme une méthode importante pour la production des NTC à grande échelle [Che et al., 1998]. Dans ce procédé, un mélange de gaz d'hydrocarbures (éthylène, méthane ou acétylène) et un gaz de procédé (ammoniac, azote, hydrogène) sont réunis dans une chambre de réaction sur un substrat métallique chauffé à la température d'environ 700-900°C, à la pression atmosphérique. Les NTC sont formés à la suite de la décomposition des gaz d'hydrocarbures et de leur dépôt sur un catalyseur de métal (substrat). C'est la méthode la plus prometteuse. Il s'agit de la technique la moins coûteuse et qui demande des températures plus faibles. En 1999, la méthode HiPco® a été développée à l'Université Rice pour la production des NTC [Nikolaev, 2004]. Celle-ci consiste à introduire le catalyseur en phase gazeuse. En effet, le catalyseur et les gaz d'hydrocarbures sont placés dans un four. Le monoxyde de carbone est le gaz utilisé comme gaz d'hydrocarbure qui réagit avec le pentacarbonyle de fer. Une autre méthode récemment développée à l'Université de l'Oklahoma est basée sur des catalyseurs de cobalt (Co) et de molybdène (Mo) et du monoxyde de carbone (CO). En effet, elle a le même principe que les autres méthodes de la même voie de synthèse, mais la pression totale dans le four est comprise entre 1 à 10 atm. Donc cette voie chimique, la voie de synthèse à

température moyenne, présente beaucoup plus d'avantages que les voies physiques à haute température. Le processus de réaction est plus simple, facile à contrôler et à manipuler. Les méthodes chimiques sont moins coûteuses et faciles à produire à grande échelle. Les NTC sont directement produits sur les substrats. Le processus de la collecte et de séparation est plus facile, et en général il n'y a pas d'étape de purification à faire.

2.5 Propriétés et applications

Selon des rapports publiés, la capacité annuelle de production de NTC était de 0,2 kilotonne en 2005 et a atteint 4,6 kilotonnes en 2011 [De Volder et al. 2013]. Il a été estimé que la valeur totale de la production devrait être de 1,3 milliards de dollars en 2015 (soit d'environ 9 300 tonnes) [Parish, 2011]. Les NTC possèdent des propriétés assez remarquables, ce qui suscite l'intérêt de plusieurs industries.

Propriétés mécaniques

Dans les feuillets de graphène des NTC, les orbitales sont hybridées sp^2 en configuration entre les atomes de carbone ($C=C$). Le lien sp^2 est encore plus fort que la liaison dans le diamant où tous les atomes de carbone sont hybridés en sp^3 . Les NTC ont une forte résistance et sont donc considérés comme des fibres au potentiel exceptionnel et donc ils ont une forte résistance. Ils ont une résistance 100 fois plus élevées que l'acier pour un poids six fois moindre. En même temps, ils ont une grande élasticité et une grande flexibilité. Malgré leur grande rigidité, lorsque les NTC sont exposés à de grandes forces de compression axiales, ils peuvent se plier, se torsader, s'allonger et former des boucles sans endommager les NTC. Ceci est réversible à la plupart des déformations. La soie d'araignée est la structure qui présente le plus d'analogie avec les nanotubes de carbone [Yakobson et al. 1998].

Propriétés électriques

Les NTC ont une conductivité plus grande que celle du diamant. En fonction de sa géométrie (diamètre du tube et angle d'enroulement du feuillet de graphène), un NTC pourra être soit un isolant, soit un conducteur métallique ou un semi-conducteur. Ils ont une conductivité supérieure à celle du cuivre et 70 fois supérieures à celle du silicium. Ils peuvent aussi transporter des densités de courant d'environ 10^{10} A/cm² soit au moins deux ordres de

grandeur de plus que les métaux. De plus, les NTCSP possèdent des caractéristiques électriques plus importantes que les NTCMP à cause des interactions électriques, de type Van der Waals qui se créent entre les différents feuillets de graphène. Avec des tensions relativement faibles, à partir des extrémités des NTC, il peut y avoir une génération de champ électrique remarquable, capable d'arracher les électrons de la matière et de les émettre vers l'extérieur.

Propriétés biologiques

Les NTC possèdent aussi des propriétés biologiques très intéressantes. Ils ont un grand potentiel pour l'application en biologie et en médecine pour la bio-imagerie.

Applications

Grâce à leurs caractéristiques les plus attrayantes, les NTC se retrouvent dans plusieurs objets utilisés au quotidien. En effet, plusieurs équipements de sport sont fabriqués en NTC, par exemple les raquettes de tennis, pour avoir une grande solidité tout en gardant un poids léger et une grande souplesse. Ceci s'applique aussi pour le renforcement des cadres de vélo. Un gilet de pare-balle est aussi renforcé au NTC. En effet, les NTC insérées dans le gilet pourraient réagir à la pression appliquée par une balle sur le matériel et se durcir suffisamment pour la bloquer. Il en résulterait une armure flexible qui pourrait dévier les balles comme le ferait une armure d'acier, mais avec un poids plus léger. Les nanotubes de carbone sont l'une des principales substances de construction dans les nanotechnologies et ils ont un grand potentiel pour des applications dans l'électronique, l'ingénierie, les technologies informatiques, l'aérospatiale etc. De même, étant meilleurs conducteurs thermiques que le cuivre, les NTC servent à dissiper l'énergie pour éviter la surchauffe dans les circuits de moteurs automobiles. Ils sont aussi utilisés comme additifs pour polymères afin de rendre les plastiques plus élastiques et résistants. De plus, grâce à leurs propriétés d'émission de champ, les NTC sont utilisés de nos jours comme une matière pour les écrans plats et tactiles des téléphones, télévision, etc. Des biocapteurs à base de NTC pourraient être utilisés afin de détecter des cellules cancéreuses. Les NTC peuvent servir aussi pour traiter des cellules en les greffant avec des anticorps spécifiques. En effet, grâce à la structure d'un NTC, ce dernier pourrait être un translocateur thérapeutique pour l'administration d'un médicament [Zhang, et al., 2007].

3. Risques sur la santé humaine et l'environnement

3.1 Effets sur l'homme (producteurs et utilisateurs)

Les NTC suscitent un grand intérêt pour les industries, en raison de leurs nombreuses utilisations actuelles et potentielles, notamment en médecine. Cependant, en face de ces utilisations croissantes des NTC, il existe un risque toxicologique potentiel encore peu caractérisé de ces matériaux, aussi bien pour les utilisateurs que les travailleurs.

Il est important d'évaluer en amont les dangers de ces expositions à partir d'une meilleure connaissance des effets biologiques de ces nanomatériaux.

3.2 Voies d'exposition

Les voies classiques de pénétration d'un toxique dans l'organisme chez l'homme (respiratoire, cutanée et orale) s'appliquent aux NTC. La discussion sera ciblée sur la voie respiratoire qui représente la voie d'exposition majoritaire du fait de la production des ces NP sous forme d'aérosol et pour laquelle un risque a été identifié à travers le suivi des travailleurs des industries impliqués dans la production ou la manipulation de ces NP.

Voie respiratoire

L'appareil respiratoire est constitué de deux parties : une partie extra-thoracique comprenant les voies aériennes supérieures incluant les fosses nasales, le larynx et le pharynx et une partie intra-thoracique incluant la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires. En milieu de travail, plus spécifiquement dans les industries fabriquant des NTC, les travailleurs sont exposés directement aux NTC. Lorsque ces particules sont sous forme de poudre, elles sont très volatiles. Or, ces NP sont normalement absorbées principalement par la voie pulmonaire. Les NP aéroportées inhalées pourront se déposer tout le long de l'arbre pulmonaire et au niveau alvéolaire. De par leur taille nanométrique, une fraction des particules peut franchir les organes extra-pulmonaires. Ceci implique une migration de certaines particules solides, la translocation, à travers les couches épithéliales pulmonaires jusqu'aux systèmes sanguin et lymphatique de même qu'à travers les terminaisons nerveuses des nerfs

olfactifs, le long des axones neuronaux jusqu'au système nerveux central [Ostiguy et al., 2008b]. L'impact d'une exposition à ces NP par respiration peut se traduire par une inflammation pulmonaire et une augmentation des maladies respiratoires chroniques (ex. asthme), et pourrait aussi être responsable de graves infections pulmonaires (ex. cancer des poumons).

C'est pour cela dans ce projet, l'évaluation de la toxicité des NTC a été réalisée sur les cellules alvéolaires de pneumocyte type II, A549. Ces cellules constituent avec les pneumocytes de type I et les macrophages alvéolaires le poumon profond, lieu des échanges gazeux avec le sang. Les pneumocytes de type II sécrètent le surfactant pulmonaire capable de fluidifier le mucus et de faciliter les échanges gazeux.

Voie cutanée

Il ne semble pas y avoir d'évidences montrant qu'il y a pénétration dans les strates profondes de l'épiderme d'une peau saine, mais il est possible que ce soit le cas sur une peau abîmée et/ou frottement mécanique (allergie, dermatite, circulation systémique). De plus, les NTC sont hydrophobes et donc ces derniers semblent pouvoir traverser la peau [Elgrabli, 2008].

Voie orale

Le tractus gastro-intestinal représente une voie d'entrée pour plusieurs NP, à la fois directement par l'ingestion intentionnelle (ex. suppléments alimentaires) ou indirectement (ex. NP dans l'eau ou un produit de dégradation de bien de consommation enduits à l'origine de NP) [Bergin & Witzmann, 2013]. Le tractus gastro-intestinal est un site d'interactions symbiotiques, complexes entre des cellules hôtes et la microflore résidente [Bergin & Witzmann, 2013]. Par conséquent, l'évaluation des nanoparticules doit prendre en considération non seulement l'absorption et l'accumulation d'organes extra-intestinale, mais aussi le potentiel que des bactéries intestinales soit modifiées et que ceci provoque les effets perturbateurs sur l'hôte [Bergin & Witzmann, 2013].

3.3 Effets sur l'environnement

L'utilisation des énormes quantités de NTC peut poser la question de leur éventuel impact environnemental en cas de rejet accidentel ou au cours du cycle de vie des produits. En effet, cela peut aussi entraîner l'émission d'une quantité massive de NTC dans l'environnement tel que les lacs, l'air et le sol. Insolubles dans l'eau et lipophiles dans la nature, ils sont l'un des matériaux les moins biodégradables. Donc, par l'accumulation de ces NTC lipophiles, ils pourraient entrer et modifier la chaîne alimentaire. Cependant, puisque l'environnement est naturellement riche en carbone, il est difficile pour les chercheurs de quantifier et d'identifier des NP et surtout les NTC. Ceci mène à peu de publication d'études sur la contamination et les impacts à court et à long terme des NTC dans l'environnement. Selon une étude, l'équipe de Dr Parks ont montré que les NTCSP sont bioaccessibles pour les organismes benthiques marins, mais ils ne semblent pas s'y accumuler ou y provoquer une toxicité [Parks et al., 2013].

4. Études de nanotoxicologie

4.1 Études *in vitro*

Plusieurs études ont été réalisées sur différents modèles cellulaires afin d'évaluer la cytotoxicité des NTC.

Tout d'abord, puisque la voie majeure d'exposition aux NTC est l'inhalation, plusieurs tests ont été réalisés sur des modèles de cellules pulmonaires telles que les cellules : épithéliales alvéolaires humaines A549, épithéliales bronchiques BEAS-2B et macrophages alvéolaires des rats NR8383. En 2007, M. Davoren et al. ont testé la cytotoxicité des NTCSP (contenant 10% de fer) dont leur diamètre varie de 0,8 à 1,2 nm. Ils ont évalué la viabilité des cellules A549 exposées à ces NP à l'aide des essais suivants : AlamarBlue® (AB), rouge au neutre (NR) et MTT, dont l'activité métabolique, lysosomal et mitochondrial sont respectivement évalués pendant 24h [Davoren et al., 2007]. Avec un intervalle de concentration de NTCSP (1,56 à 800 µg/mL), ils ont montré qu'il y a une diminution significative de la viabilité cellulaire à 400 et 800 µg/mL [Davoren et al., 2007]. Dans une

autre étude, Pulskam et al. ont montré avec l'essai MTT que les NTCSP diminuent la viabilité des cellules A549 et NR8383 de 60% à une concentration de 100 µg/mL après 24h d'exposition [Pulskam et al., 2007]. Cependant, avec un essai basé sur le même principe que le test MTT, les données du test WST-1 ont indiqué aucune cytotoxicité aiguë de ces mêmes NTCSP [Pulskam et al., 2007]. Or, ils ont montré, en comparant avec différents tests de viabilité cellulaire, que les NTC semblent interférer avec le produit de formazan de l'essai MTT, ce qui donne des faux positifs [Pulskam et al., 2007]. Cette interférence est aussi démontrée dans plusieurs autres lignées cellulaires [Wörle-Knirsch et al., 2006]. De plus, ils ont montré que les catalyseurs associés aux NTCMP manufacturés sont responsables de plusieurs effets tels que l'augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et la diminution du potentiel de la membrane mitochondriale des deux types de cellules, contrairement aux NTCSP purifiés. Cependant, il serait plus intéressant de comparer entre les NTCSP manufacturés et les NTCSP purifiés. De même, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse du rôle d'un stress oxydant. En effet, Shvedova et al. ont exposé les BEAS-2B à différentes concentrations de NTCSP (60, 120 et 240 µg/mL) [Shvedova et al., 2003]. Ils ont observé une apoptose des cellules associées à un stress oxydant dû à la formation de radicaux libres et une diminution des antioxydants dans les cellules. Ils concluent que l'exposition aux NTCSP induit un effet cytotoxique aux cellules pulmonaires [Shvedova et al., 2003].

L'inflammation est un deuxième mécanisme observé par plusieurs chercheurs. En effet, Zhang et al. ont exposés les cellules de kératinocytes épidermiques humaines (HEK) à 50 µg/mL de NTCSP pendant 24 et 48h [Zhang, et al., 2007]. Ils ont observé une réponse d'irritation par l'augmentation des cytokines proinflammatoires interleukines 8 [Zhang, et al., 2007]. Comme observé avec les BEAS-2B, Shevoda et al. ont testé les NTCSP avec les mêmes conditions d'exposition des NTCSP sur les cellules HEK [Shvedova et al., 2004]. Ils ont obtenu les mêmes résultats qu'avec les cellules BEAS-2B (augmentation des radicaux libres). De plus, ils ont indiqué que l'exposition aux NTCSP non purifiés peut mener à une augmentation de la toxicité cutanée chez les travailleurs exposés [Shvedova et al., 2004]. Manna et al. ont observé une augmentation du stress oxydant à des doses faibles (0,5 à 10 µg/mL) pendant 12 à 72h et une inhibition de la prolifération des cellules HEK [Manna et al., 2005].

La diminution de la prolifération cellulaire a été aussi observée dans d'autres types de cellules. En effet, en 2005, Cui et collaborateurs, ont montré que l'incubation des cellules embryonnaires humaines de rein HEK293 avec différentes concentrations de NTCSP s'est traduite par une diminution de la prolifération cellulaire et l'induction d'apoptose dès 25 µg/mL de NTC [Cui et al., 2005].

Plusieurs chercheurs montrent que les NP sont accumulées dans les cellules A549. L'internalisation des NP est beaucoup plus massive pour les TiO₂ que pour les NTC [Singh et al., 2007]. Des études ont montré que les NTC internalisent les cellules, mais s'accumulent spécifiquement dans des macrophages [Bussy et al., 2008; Pulskamp et al., 2007] ou des lymphocytes [Dumortier et al., 2006].

Concernant les études génotoxiques, il existe une étude où ils ont montré que les NTCSP ont provoqué des altérations chromosomiques. En exposant les cellules BEAS-2B aux NTCSP, ils ont observé une augmentation significative du pourcentage de cellules présentant des anomalies de la mitose et une fragmentation du centrosome dès la plus faible dose (24 µg/mL) [Sargent et al., 2009].

4.3 Études *in vivo*

Les premières études portant sur la toxicité des NTC *in vivo* ont été réalisées par instillation intratrachéale (IT) [Huczko et al., 2005, Lam et al., 2004, Muller et al., 2005, Sayes et al. 2007]. Au niveau des poumons des rongeurs, Lam et al. ont démontré l'apparition de granulomes à des fortes doses de 0,1 à 0,5 mg chez la souris et 0,1 à 5 mg chez le rat [Lam et al., 2004]. Les granulomes pulmonaires sont des structures anatomopathologiques constituées d'un amas de cellules épithélioïdes entourés de lymphocytes au niveau du parenchyme pulmonaire. Ils sont généralement dus à une réaction localisée face à la présence d'un élément étranger [Lam et al., 2004]. Dans le cas des NTC, les granulomes ont été décrits au niveau alvéolaire, mais également au niveau de l'interstitium pulmonaire. Associés à ces granulomes, une fibrose borde la périphérie de la lésion dont les origines sont encore mal connues. Cette

fibrose se caractérise par un épaississement du tissu alvéolaire qui est composé de collagène et d'élastine. Ces résultats sont appuyés par les travaux de Chou et al. où ils ont aussi observé la formation de granulomes dans le parenchyme pulmonaire de souris, deux semaines après l'administration par IT de 500 µg de NTCSP par souris [Chou et al., 2008]. Mangum et collaborateurs ont montré une augmentation de la quantité de collagène à 60 jours chez des rats traités avec 0,4 mg de NTCSP [Mangum et al., 2006]. Avec l'imagerie par résonance (IRM), Al Faraj et al. ont pu détecter la présence des NTCSP dans les poumons chez le rat. Ainsi en administrant par IT de NTCSP, de façon temps- et dose-dépendante, ils ont observé l'apparition des granulomes et l'inflammation [Al Faraj et al., 2010]. En termes de réponse inflammatoire, différents travaux ont montré une augmentation de neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et macrophages alvéolaires dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) de souris traitées par 0,01 à 0,5 mg de NTCSP [Lam et al., 2004; Shvedova et al., 2005] ou de rats traités par 0,5 à 2 mg de NTCMP [Muller et al., 2005]. Ces observations sont associées à l'augmentation de la quantité de cytokines proinflammatoires [Muller et al., 2005; Shvedova et al., 2005]. Dans une autre publication, Sato et al. ont implanté une dose de 0,1 mg de NTC dans le tissu sous-cutané de rats. Ils ont indiqué qu'il n'y avait pas de nécrose tissulaire, ni inflammation, mais apparition de granulomes [Sato et al., 2005].

La plupart des études in vivo évaluant le risque cancérigène du NTCSP ont observé des changements histologiques similaires à l'amiante dans les modèles murins. En effet, plusieurs auteurs cherchent à savoir si les NTC sont aussi dangereux que l'amiante [Poland et al., 2008; Takagi et al., 2008]. Ceci s'explique par le fait que les NTC ressemblent aux fibres d'amiante. Ces fibres ont un faible diamètre pour une longueur élevée et ont une forte stabilité chimique dans les environnements physiologiques se traduisant par une longue biopersistance [Murr & Soto, 2004]. La comparaison avec l'amiante a fait naître des préoccupations, car il y a une possibilité de développement de tumeurs provoquées par l'exposition aux NTC. Afin de tester l'hypothèse que les NTC peuvent se comporter comme l'amiante, Poland et al. ont injecté différents types de particules avec fibres longues (l'amiante et NTCMP) et des particules ne contenant pas de fibres longues (noir de carbone et NTMP dispersés en agrégats) dans la cavité péritonéale de souris pendant 7 jours [Poland et al., 2008]. Avec la microscopie électronique, ils ont observé que les échantillons contenant des fibres longues droites

(l'amiante et NTCMP) provoquait une inflammation ainsi que l'apparition de cellules géantes et de granulomes [Poland et al., 2008]. Par contre, les échantillons qui ne contenaient pas de fibres longues (noir de carbone et NTCMP dispersés en agrégats) n'ont causé aucune réaction inflammatoire ni de formation de granulomes [Poland et al., 2008].

En ce qui concerne l'exposition par ingestion, des chercheurs ont administré chez la souris pendant 3h par gavage 100 µg/mL d'une solution à 15 µg/mL de NTCSP. Ils ont observé une distribution de NTCSP dans la majorité des organes et tissus, principalement dans le foie [Cherukuri et al. 2006], mais pas dans le cerveau [Wang et al., 2004]. De plus, les NTCSP ont traversé plusieurs compartiments et ont été retenus dans les os. Il existe une autre étude où les résultats sont contradictoires montrant que les NTC ne sont présents dans aucun organe du système réticulo-endothélial (foie, rate) [Singh et al., 2006].

En conclusion, ces résultats montrent la complexité de l'étude de la toxicité des NTC et la nécessité de prendre en compte de multiples paramètres comme :

- le type de synthèse des NTC (ex. voies chimiques ou voies physiques)
- la structure des NTC (diamètre et longueur)
- la composition des NTC (ex. ajout de catalyseurs métalliques tels que le fer)
- la méthode et milieu de dispersion des NTC (ex. ajout de l'albumine sérique bovine (BSA) comme agent dispersant)
- l'état d'agglomération des NTC
- le modèle des cellules utilisé

Les études réalisées à ce jour ne dévoilent pas des données suffisantes pour évaluer les risques suite à une exposition à ces NP.

Dans chaque étude, un contrôle positif est nécessaire afin de prouver l'efficacité et montrer l'effet attendu de l'essai. Afin de mieux évaluer les effets de cytotoxicité des NTC, plusieurs chercheurs utilisent le quartz comme un contrôle positif [Davoren et al., 2007, Lam et al., 2004, Sayes et al. 2007]. Cependant, dans notre projet de recherche, un autre type de NP, les points quantiques (PQ), ont été utilisés comme référentiel de toxicité cellulaire. En effet, dans le laboratoire de Dr Karim Maghni, son équipe a montré que les expositions des cellules A549 à 100 µg/mL des PQ ont induit une mortalité cellulaire et une diminution

marquée de l'activité mitochondriale [Bergeron-Prevost, 2015]. Lovric, J et al. ont aussi montré que les PQ ont induit la mort des cellules microgliales N9 caractérisée par la condensation de la chromatine et l'apparition des bulles apoptotiques [Lovrić et al., 2005].

4.4 Études épidémiologiques

Dans la littérature, jusqu'à présent, il existe très peu d'enquêtes épidémiologiques concernant l'exposition des humains, que ce soit des travailleurs ou des utilisateurs, aux NTC. Pour évaluer si NTC peuvent induire des risques importants pour la peau, quarante volontaires, susceptibles d'une réaction allergique et d'irritation, ont été exposés pendant 96h à un test cutané consistant en un papier filtre Whatmann saturé d'une solution contenant de NTC [Huczko & Lange, 2001]. Le test a montré que les NTC n'ont pas causé d'irritation ni d'allergie [Huczko & Lange, 2001]. Cependant, plusieurs recherches tirent des conclusions à partir des études de particules fines ou ultrafines par voie respiratoire. Par exemple, l'équipe de Peters et al. montre que de fortes doses en particules fines (particules dont la taille est inférieure à 2,5 µm) ont un impact à court terme sur l'état de santé en particulier en ce qui concerne les problèmes respiratoires et cardiovasculaires [Hinkov, et al., 2010 ; Peters et al., 1997]. Des études à plus long terme indiquent que l'exposition à de fortes concentrations en particules fines peut conduire à une réduction de l'espérance de vie [Hinkov, et al., 2010 ; Brunekreef, 1997; Maynard et al., 2002].

5. Objectif et démarche de l'étude

La société Raymor est la seule au Québec à fabriquer des NTC et l'une des rares au niveau mondial à produire les NTCSP avec une capacité d'environ quatre tonnes par an. Elle a été incorporée en 1980 en tant que compagnie minière de lithium. Dès 2005, elle a rapidement développé sa technologie de production au plasma ce qui a mené à la mise en marché de plusieurs produits exceptionnels dont les NTCSP. Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr Maghni, l'industrie Raymor s'intéresse à l'étude de biosécurité de deux types de NTCSP, dopés (RN 003) ou non à l'azote (RN 000).

Dans le cadre de ce projet, nous évaluerons les effets cytotoxiques des NTCSP sur les cellules épithéliales alvéolaires humaines pneumocytes de type II (la lignée A549). Comme la plupart des NTCSP produits à ce jour, nous postulons que ces nanomatériaux présenteraient un certain niveau de toxicité chez la lignée A549. L'étude est divisée en deux parties:

1) Détermination de la viabilité cellulaire déterminée par :

- ⇒ le test MTS : Ce test a le même principe que l'essai MTT. Ces tests sont à base de sels de tétrazolium. L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan.
- ⇒ le test PrestoBlue® : Ce test a le même principe que l'essai AlamarBlue®. Ces tests sont basés sur la résazurine utilisée comme indicateur sensible de l'état oxydoréducteur du milieu intracellulaire.
- ⇒ le test d'exclusion au bleu de trypan.

2) Détermination de la mort cellulaire par :

- ⇒ la coloration HT-IP
- ⇒ la mesure des corps apoptotiques « *Apoptotic Blebs* ».

Matériel et méthodes

1. Nanoparticules

Deux NTCSP: (RN 000 et RN 003) ont été fournis par la Société Raymor Nanotech. Ils contiennent 40% de NTC et le reste, soit le 60 %, est constitué d'impuretés composées d'un mélange de catalyseurs (Nickel et Yttrium) et de carbone amorphe. Leur taille est comprise entre 10 à 15 nm. La principale caractéristique qui distingue les deux NTCSP est que les RN 003 ont été dopés à l'azote à leur surface, c'est-à-dire une substitution de quelques atomes de carbone par des atomes d'azote. Les points quantiques (PQ), achetés auprès de la société ViveNano (Ontario, Canada) ont été utilisés comme contrôle positif de toxicité des nanomatériaux validés dans le laboratoire. Le noyau des PQ est composé d'un mélange de cadmium et de sélénium et la couche externe, de cadmium et de soufre (CdSe/CdS). La taille des PQ est de 1 à 10 nm et leur spectre d'émission se situe dans le vert ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$).

2. Dispersion des NTC

Une suspension composée de BSA (0,05%) et d'éthanol (0,5%) (pureté : 96-100%) contenus dans de l'eau distillée a été utilisée pour disperser 2 mg/mL de NTCSP. Brièvement, la suspension de NTC a été dispersée pendant 16 minutes, à l'aide du sonicateur Ultrasonic cleaner Branson 200 de Process Equipment & Supply (Cleveland, OH, USA), afin de permettre leur bonne homogénéisation. Ils ont par la suite été dilués à des concentrations allant de 10 à 1000 $\mu\text{g/mL}$. Les PQ, déjà en solution, ont été utilisés à des concentrations allant de 100 à 1000 $\mu\text{g/mL}$ dans le milieu de culture.

3. Culture cellulaire

Les cellules A549 ont été achetées de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassa, VA, USA). Ce sont des cellules épithéliales alvéolaires issues d'un adénocarcinome humain, communément acceptées comme modèle de pneumocytes de type II. La lignée A549 est le modèle cellulaire majeur utilisé dans les études de biosécurité des nanomatériaux. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM-F12 de HyClone (Logan, UT, USA), supplémenté

avec 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) inactivé (HyClone), 2 mM de L-glutamine de Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada), 100 U/mL de pénicilline (Life technologies) et 100 µg/mL de streptomycine (Life technologies) dans un incubateur à 37 °C, sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Les passages cellulaires ont été réalisés tous les 2 ou 3 jours afin de maintenir les cellules en culture. Brièvement, les cellules adhérentes contenues dans la flasque ont été lavées au PBS 1X puis décollées à l'aide de la trypsine (HyClone) suite à une incubation pendant 2 à 5 minutes, à 37°C. La trypsine a été inactivée suite à l'ajout de milieu complet contenant 10% de FBS. Les cellules ont été centrifugées à 400g durant 3 minutes. Le culot de cellules a été resuspendu dans un volume de milieu complet permettant le compte cellulaire. Afin de déterminer la concentration des cellules viables, une proportion des cellules, soit 100 µL, a été mélangée avec 10 µL d'une solution de bleu de trypan 0,4% de Sigma Aldrich® (Oakville, Ontario, Canada). Le bleu de trypan colore les cellules mortes en bleu ce qui permet de les exclure lors du compte cellulaire réalisé à l'aide d'un hémacytomètre et d'un microscope de Leica Microsystems (Concord, Ontario, Canada).

4. Exposition des cellules aux NTC et PQ

Les cellules ont étéensemencées sur des plaques de 12 puits. Les cellules ont ensuite été exposées à différentes concentrations (10, 50, 100, 200, 500 et 1000 µg/mL) de RN 000 ou RN 003. Cette large gamme de concentration a été définie en se basant sur les études réalisées sur l'estimation des nanoparticules dans l'air ambiant [Mueller & Nowack, 2008]. Les cellules utilisées à titre de contrôle positif de toxicité ont, quant à elles, été exposées à 1000 µg/mL de PQ. Les cellules ont été exposées aux différentes nanoparticules (NP) pendant 24, 48 ou 72h. Toutes les NP ont été diluées dans un milieu de culture supplémenté avec 5% de FBS. Les résultats ont été comparés aux cellules recevant le milieu de culture sans NP (contrôle négatif).

5. Détermination de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide de trois tests différents: le test MTS, le test PrestoBlue® et le test d'exclusion au bleu de trypan. Les interférences potentielles des particules RN 000 et RN 003, avec les différents essais de viabilité cellulaire, ont été

déterminées.

6. Test MTS

L'essai MTS est une méthode de dosage par colorimétrie utilisée pour mesurer la viabilité cellulaire via l'activité enzymatique redox non-spécifique. Le réactif MTS, un produit perméable à la cellule de couleur jaune pâle, est réduit par la succinate déshydrogénase des cellules vivantes actives en formazan, un composé de couleur jaune foncé soluble dans le milieu de culture cellulaire. Le kit employé est le CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA) qui comprend les réactifs PMS, un réactif de couplage d'électron (méthosulfate de phénazine) et MTS (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, sel interne). L'activité mitochondriale a été aussi évaluée en utilisant ce test. Les cellules ont étéensemencées sur une plaque de 96 puits (5 000 cellules / puits). Suite à une exposition de 24h aux NP, un mélange 1 :20 (PMS: MTS) a été effectué et 20 µL ont été ajoutés à chaque puits et la plaque a été incubée pendant 90 min. La quantité de formazan produite est proportionnelle au nombre de cellules viables. La densité optique, elle-même proportionnelle à la quantité de formazan, a été mesurée à 490 nm avec une longueur d'onde de référence à 690 nm en utilisant un lecteur de microplaques ELISA Ultra Microplate Reader ELX808IU (Bio-Tek Instruments, USA) et du logiciel KC4 (version 2.7 rev 8). Chacune des huit conditions d'exposition a été réalisée en une expérience distincte. La cytotoxicité a été calculée comme suit:

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = [(\text{DO des cellules contrôles} - \text{DO des cellules exposées aux NP}) / (\text{DO des cellules de contrôle})] \times 100$$

7. Test de PrestoBlue®

Cet essai est une méthode de dosage par fluorescence utilisée pour mesurer la viabilité cellulaire. Ce test utilise le pouvoir réducteur des cellules vivantes actives pour transformer le réactif résazurine (7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one 10-oxyde), un composé de couleur bleu perméable aux cellules et pratiquement non-fluorescent, en résorufine, un produit rouge fortement fluorescent. La résazurine est principalement utilisée comme un indicateur d'oxydo-réduction dans des analyses de viabilité cellulaire. Elle est également utilisée pour évaluer

l'activité métabolique des mitochondries. Le kit utilisé est le PrestoBlue® Cell Viability Reagent de Life technologies. À chaque puits est rajouté 10 µL de la solution du kit et la plaque est incubée à 37°C durant 30 minutes. La détection se fait au POLARstar Optima (BMG Labtech, Allemagne) par le logiciel OPTIMA Control (version 2.00 rev 3). La moyenne de l'intensité de fluorescence (MIF) a été mesurée à une $\lambda_{\text{excitation}} = 560 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 590 \text{ nm}$. Chacune des six conditions d'exposition a été réalisée en une expérience distincte. La cytotoxicité a été calculée comme suit:

Cytotoxicité (%) = [(MIF des cellules contrôles – MIF des cellules exposées aux NP) / (MIF des cellules contrôles)] x 100.

8. Test d'exclusion au bleu de trypan

Dans cet essai, les cellules viables excluent le colorant alors que les cellules mortes sont perméables, et ainsi sont colorées en bleu. Suite à l'exposition aux NP, les cellules ont été traitées à la trypsine (afin de les détacher de la surface du puits de culture) et les culots cellulaires ont été remis en suspension en présence de la solution de bleu de trypan et comptées à l'aide d'un hémacytomètre. Chacune des sept conditions d'exposition a été réalisée en une expérience distincte. La viabilité cellulaire a été calculée comme suit:

Viabilité (%) = [(cellules totales - cellules colorées en bleu) / cellules totales] x 100

9. Détermination de la mort cellulaire

La mort cellulaire ou la diminution de la viabilité des cellules se fait principalement par deux mécanismes : 1) la mort cellulaire programmée (apoptose) induite par des facteurs internes (par exemple le ligand Fas) ou externes (par exemple une NP) et 2) la mort prématurée de la cellule (nécrose) induite par des facteurs externes (par exemple une NP). Les essais de cytotoxicité ne peuvent pas distinguer entre ces deux mécanismes principaux de mort cellulaire, car ces tests ont déterminé la réponse cellulaire finale lorsque l'apoptose ou la nécrose sont induits, c'est à dire la diminution de la viabilité cellulaire. Par conséquent, pour déterminer le mécanisme d'interactions des cellules A549 humaines avec les NTCSP, l'induction de l'apoptose cellulaire ou des processus de nécrose a été étudiée par les tests suivants : la coloration HT-IP et la mesure des corps apoptotiques.

10. Coloration HT-IP

À la fin de chaque temps d'exposition, les cellules ont été colorées avec Hoechst 33342 (2'-(4-éthoxyphényl)-5-(4-méthyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazole; HT) de Life technologies, puis avec de l'iodure de propidium (IP) de Sigma Aldrich afin d'examiner les changements dans la structure de l'ADN. L'analyse par microscopie de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} =$ filtre 360-425 nm) a été réalisée en utilisant un microscope à épifluorescence de la compagnie Olympus (Markham, Ontario, Canada). L'IP est exclu par les cellules viables (intégrité de la membrane cellulaire intacte). En ce qui concerne les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques, l'IP entre dans les cellules et colore les noyaux en rouge. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par une condensation de la chromatine (une coloration bleue et intense du noyau avec HT) avec la préservation de l'intégrité des membranes cellulaires (sans marquage avec l'IP). La perte de l'intégrité de la membrane cellulaire (sans coloration IP) produit une coloration rose à rouge du noyau. Les cellules nécrotiques, un autre mécanisme de la mort cellulaire, mais différent de l'apoptose, présentent des noyaux normaux, mais elles perdent l'intégrité des membranes ce qui entraîne la coloration avec l'IP, sans modifications de la morphologie du noyau. Le traitement et l'analyse de l'image ont été effectués à l'aide du logiciel Image 3D Pro 7.0 de MediaCybernetics (San Diego, CA, USA).

11. Mesure des corps apoptotiques

L'apoptose et la nécrose ont été détectées avec le kit nommé *Apoptotic Blebs* de Cayman (Ann Arbor, MI, USA) selon les instructions du fabricant. Brièvement, suite à l'exposition avec les NP, les cellules A549 ont été décollées à l'aide de la trypsine et centrifugées tel que décrit précédemment (voir culture cellulaire). Elles ont par la suite été lavées avec le tampon d'essai et elles ont été incubées avec l'anticorps capable de reconnaître la protéine de fusion scFv, exprimée à la surface des bulles présentes sur les cellules apoptotiques. Le complexe composé de la protéine de fusion scFv et de l'anticorps primaire a été détecté à l'aide d'un anticorps secondaire (IgG-lapin) marqué à la fluorescéine. Les cellules ont ensuite été incubées avec la solution d'iodure de propidium (IP) afin de mesurer le pourcentage de cellules mortes. Dans ce test, la camptothécine a été utilisée, comme témoin positif, pour entraîner l'apoptose des cellules. La camptothécine, un alcaloïde pentacyclique, est un puissant agent cytotoxique

connu pour ses propriétés induisant l'apoptose. En effet, cette molécule toxique a été démontrée pour inhiber la topoisomérase provoquant des cellules en phase S pour entrer en apoptose [Hertzberg et al., 1989]. Les PQ n'ont pas pu être utilisés puisqu'ils émettent une fluorescence dans le même spectre que l'anticorps secondaire, utilisé pour détecter la protéine scFv. Les expériences ont été réalisées par cytométrie en flux à l'aide du cytomètre Epics XL de la compagnie Beckman Coulter. Les données ont été analysées avec le logiciel Expo32.

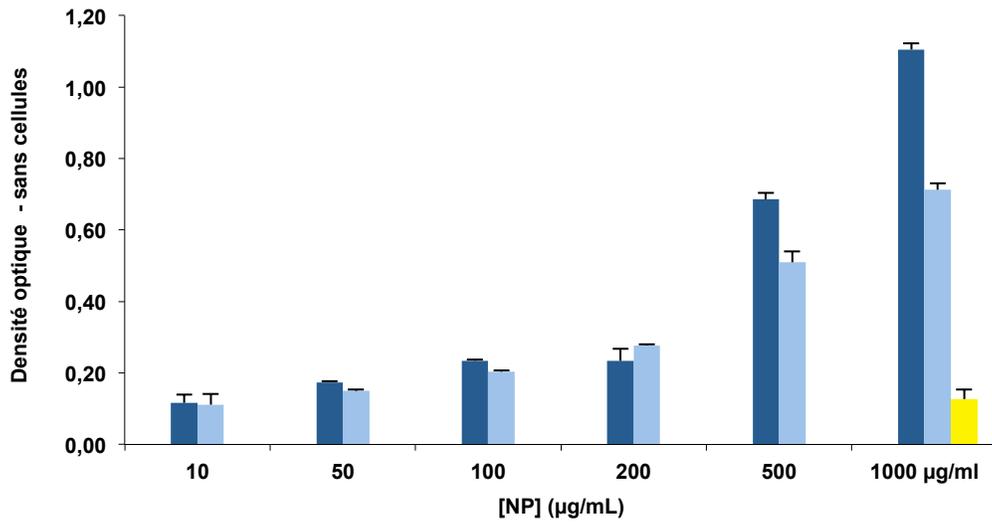
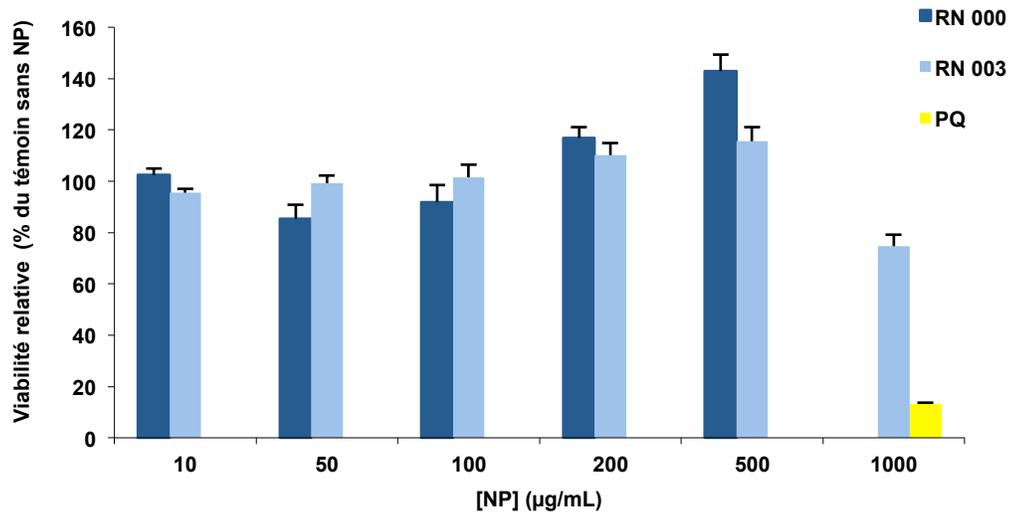
12. Analyses statistiques

L'ensemble des données obtenues est exprimé par la moyenne \pm erreur type. Pour chacun des nanotubes de carbone (RN 000 et RN 003), une analyse de variance univariée (ANOVA) en utilisant le facteur concentrations a été effectuée. Lorsque le résultat de l'ANOVA était significatif, une analyse post-hoc a été réalisée en utilisant une correction de Bonferroni afin de déterminer les différences significatives entre les niveaux. L'analyse des résultats des expériences de cinétique a été effectuée à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs dont le premier facteur était les concentrations des NTCSP et le deuxième facteur était les différents temps d'exposition. Lorsque l'interaction entre les deux facteurs était significative, une décomposition a été effectuée selon Field [Field, 2009]. Lorsque le résultat de l'un des facteurs principaux était significatif, une analyse post-hoc a été réalisée en utilisant une correction de Bonferroni afin de déterminer les différences significatives entre les niveaux. Tous les calculs statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel SPSS (V.21). Le seuil de signification choisi était de $p < 0.05$.

Résultats

1. Évaluation de la viabilité cellulaire par le test MTS lors de l'exposition à deux NTCSP

L'essai MTS a été effectué afin de vérifier la viabilité cellulaire. Ce test est un indicateur de l'intégrité du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Tel que rapporté dans d'autres études [Pulskam et al., 2007; Simon-Deckers, 2008], les NP, et en particulier les NTC, peuvent interférer avec des composants de dosages des essais de nanotoxicologie. Ainsi, dans un système exempt de cellules A549, la **figure 1. A** montre qu'il y a une augmentation de DO avec l'augmentation de concentrations de NTCSP. Donc il y a une conversion non-enzymatique des sels de tétrazolium en formazan. Par contre, en incubant les PQ avec les réactifs du kit MTS, il n'y a qu'une faible conversion de sels de tétrazolium. Ensuite, la prochaine étape était d'effectuer le test MTS en exposant les cellules A549 aux NP (**figure 1. B**). La correction pour la possible interférence entre les NP et les composants du kit MTS a été faite afin de déterminer la viabilité cellulaire (**figure 1. C**). Ceci montre qu'il y a une diminution significative d'environ 20% de viabilité cellulaire à des concentrations de RN 000 de 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$. Cependant, aucun signal n'a été détecté à 1000 $\mu\text{g/mL}$ pour RN 000, car les valeurs de DO dans cette condition expérimentale étaient sur la plage de la limite supérieure de détection du lecteur de microplaques. En effet, la solution de cette condition était opaque, cela peut s'expliquer par la formation d'agglomérats de RN 000. L'état d'agglomération des NTC est un des problèmes d'interférences avec les mesures spectrophotométriques d'absorbance retrouvé dans la littérature [Simon-Deckers, 2008]. Après correction des interférences, aucun effet du RN 003 (10 à 500 $\mu\text{g/mL}$) n'a été observé, mais à une concentration de RN 003 de 1000 $\mu\text{g/mL}$, il y a une diminution de viabilité cellulaire d'environ 74% se rapprochant du contrôle positif, PQ, représentant une toxicité d'environ 90%.

A**B**

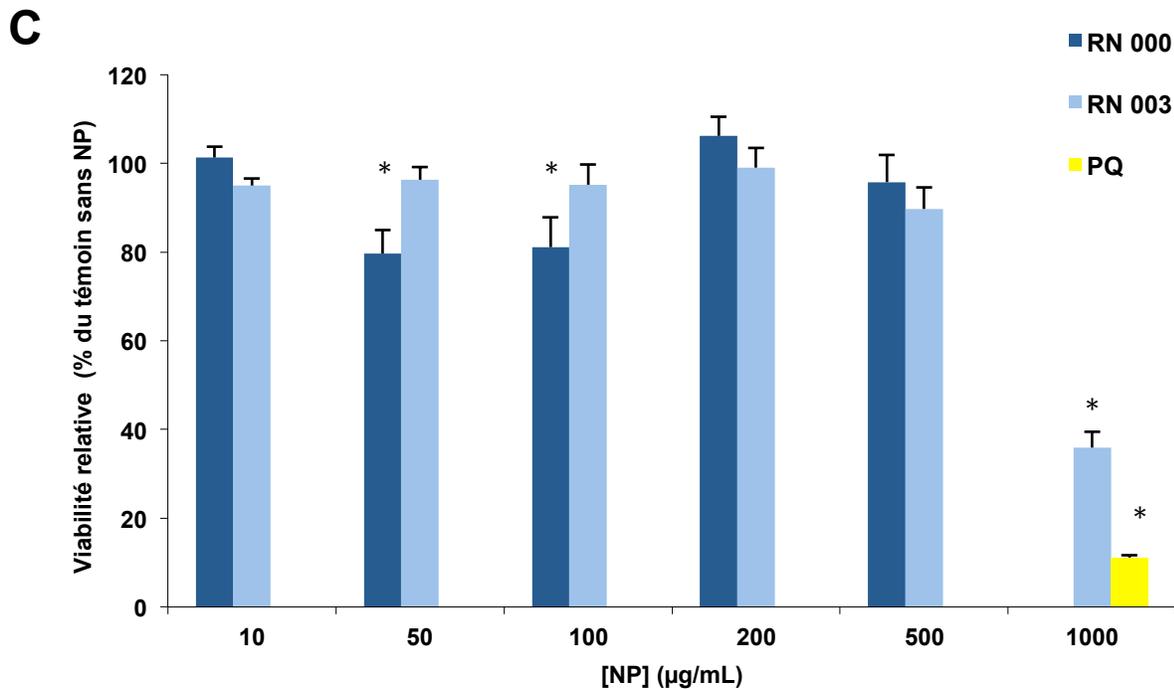
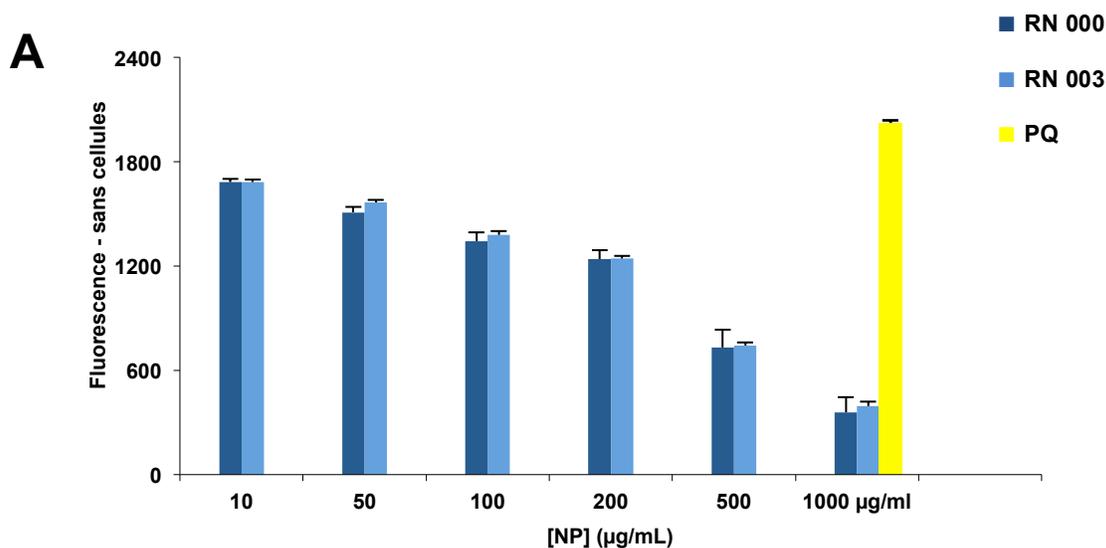


Figure 1. Interférence et la viabilité cellulaire évaluée par l'essai MTS pendant 24h.

(A) Courbe d'interférence de l'essai de MTS sans cellule exprimée en DO (B) La viabilité des cellules A549 sans correction de l'interférence (C) La viabilité des cellules A549 avec correction de l'interférence. La viabilité des cellules A549 a été exprimée en pourcentage par rapport au témoin sans les nanoparticules (NP) suite à une exposition de 24 heures en présence de deux nanotubes de carbone simple-paroi (NTCSP), soit le RN 000 (■) ou le RN 003 (▣). Les concentrations utilisées étaient de 10 à 1000 µg/mL. Un contrôle positif de nanotoxicité, représenté par les points quantique (PQ) à 1000 µg/mL (■) a également été ajouté. Les résultats sont exprimés en MOY ± E.T.M. de huit expériences indépendantes pour chaque concentration. Pour chacun des nanotubes de carbone (RN 000 et RN 003), une ANOVA a été réalisée avec un facteur inter-groupes représentant les différentes concentrations. Pour chacun des nanotubes de carbone, un effet significatif de la concentration sur la viabilité relative a été détecté. RN 000: $F(4,35)=6,801$; $p<0,05$ et RN 003: $F(5,42)=50,850$; $p<0,05$. L'astérisque représente le résultat des comparaisons multiples (avec correction de Bonferoni) : * $p < 0,05$ vs ([NTCSP]= 10 µg/mL).

2. Évaluation de la viabilité cellulaire par le test PrestoBlue® lors de l'exposition de deux NTCSP

En contraste avec l'essai MTS, lors de l'incubation de RN 000 et RN 003 avec les réactifs de l'essai PrestoBlue® dans un système acellulaire, il y a eu une diminution de la fluorescence tout en augmentant la concentration des NTCSP (**figure 2. A**). Lors de l'exposition au PQ la fluorescence est très élevée. La fluorescence lors de l'exposition à RN 000 ou RN 003 sans correction des interférences est présentée à la **figure 2. B** : la fluorescence était inférieure à 10% à 1000 µg/mL. Lorsque les corrections dues aux interférences ont été faites, les données ont montré une diminution de la viabilité des cellules humaines A549 en présence de RN 000 et de RN 003, la viabilité étant inférieure à 45% à 500 µg/mL et à 85% à 1000 µg/mL (**figure 2. C**).



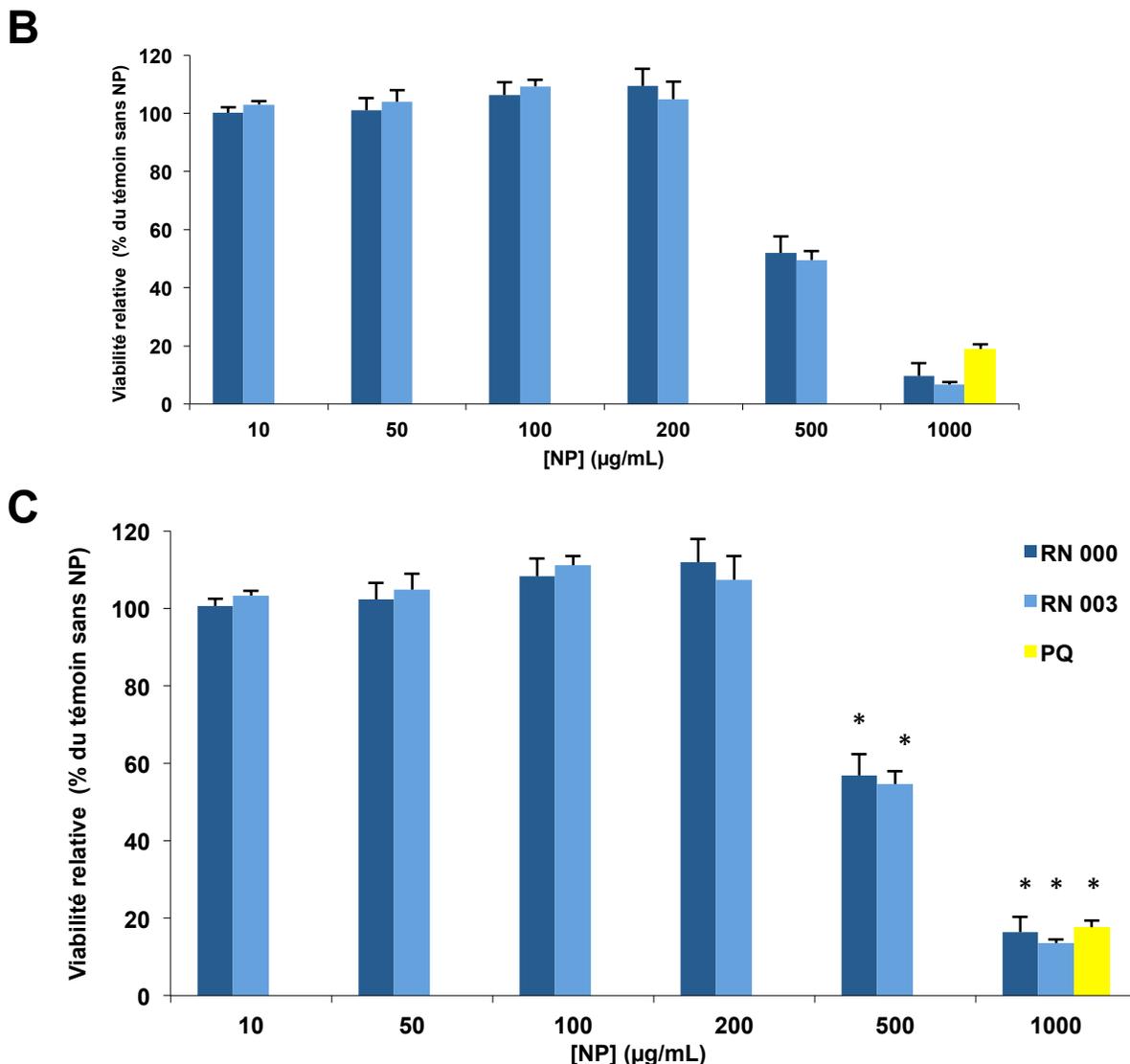


Figure 2. Interférence et viabilité cellulaire évaluées par l'essai PrestoBlue® pendant une exposition de 24h aux NTCSP.

(A) Courbe d'interférence de l'essai de PrestoBlue® sans cellule exprimée en fluorescence. (B) La viabilité des cellules A549 sans correction de l'interférence. (C) La viabilité des cellules A549 avec correction de l'interférence. La viabilité des cellules A549 a été exprimée en pourcentage par rapport au témoin sans les nanoparticules (NP) suite à une exposition de 24 heures en présence de deux nanotubes de carbone simple-paroi (NTCSP), soit le RN 000 (■) ou le RN 003 (▣). Les concentrations utilisées étaient de 10 à 1000 µg/mL. Un contrôle positif de nanotoxicité, représenté par les PQ à 1000µg/mL (■) a également été ajouté. Les résultats sont exprimés en MOY ± E.T.M. de six expériences indépendantes pour chaque concentration. Pour chacun des nanotubes de carbone (RN 000 et RN 003), une ANOVA a été réalisée avec un facteur inter-groupe représentant les différentes concentrations. Pour chacun des nanotubes de carbone, un effet significatif de la concentration sur la viabilité relative a été détecté. RN 000: $F(5,30)=91,528$; $p<0,05$ et RN 003: $F(5,30)=193,752$; $p<0,05$. L'astérisque représente le résultat des comparaisons multiples (avec correction de Bonferoni) : * $p < 0,05$ vs ([NTCSP]=10 µg/mL).

3. Effet des NTCSP sur la viabilité cellulaire des cellules A549 déterminé par le test d'exclusion au bleu de trypan :

Après une exposition aux NTCSP, les cellules adhérentes ont été lavées, décollées de la flasque à l'aide de la trypsine, centrifugées puis remises en suspension dans le tampon de bleu de trypan pour le comptage. L'évaluation de la viabilité cellulaire par cette méthode n'a, en contraste total avec les essais MTS et PrestoBlue®, permis de détecter aucune mortalité des cellules humaines A549 exposées aux RN 000 et RN 003 (**figure 3**). La toxicité élevée des PQ sur les cellules humaines A549 a toutefois été confirmée par le test au bleu de trypan pour lequel il y a une mortalité de 70%.

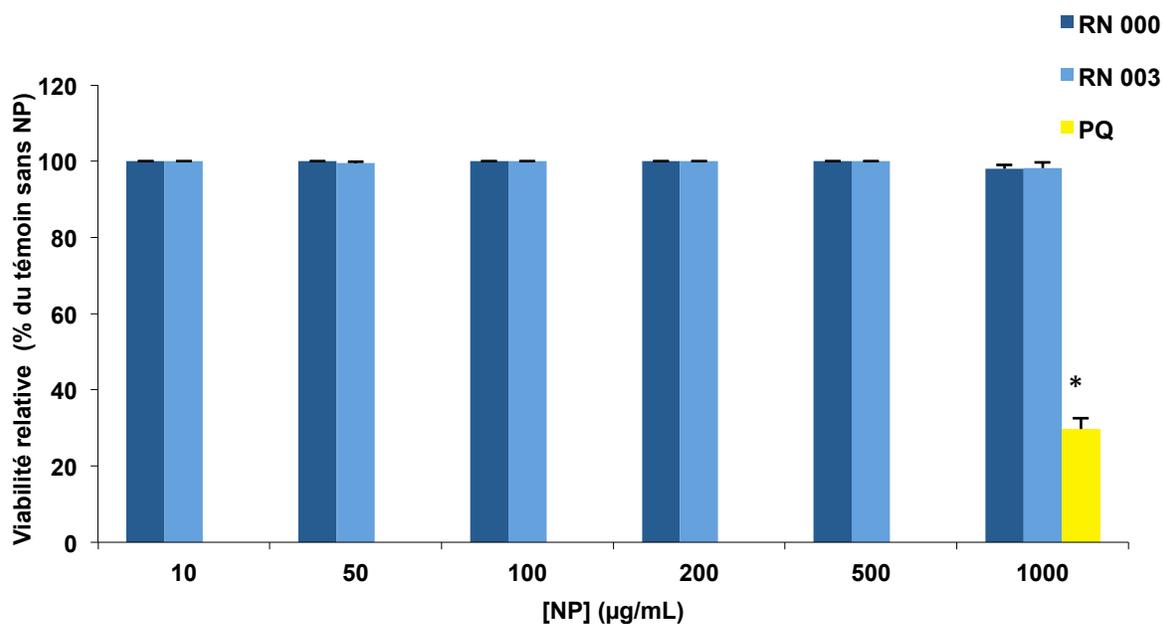


Figure 3. Viabilité cellulaire évaluée par le comptage des cellules bleues colorées au bleu de trypan.

La viabilité des cellules A549 a été exprimée en pourcentage par rapport au témoin sans les NP suite à une exposition de 24 heures en présence de deux NTCSP différents, soit le RN 000 (■) ou le RN 003 (▣). Les concentrations utilisées pour les deux NTCSP étaient de 10 à 1000 µg/mL. Un contrôle positif de nanotoxicité, représenté par les PQ à 1000 µg/mL (■) a également été ajouté. Les résultats sont exprimés en MOY ± E.T.M. de sept expériences indépendantes pour chaque concentration. * $p < 0,05$ vs ([NTCSP]= 10 µg/mL).

4. Étude de l'altération de la viabilité cellulaire par la coloration HT-IP

Puisque des résultats contradictoires ont été obtenus avec les essais MTS et PrestoBlue® comparativement à ceux obtenus avec le bleu de trypan, d'autres approches méthodologiques ont été ajoutées afin d'explorer et saisir l'altération de la viabilité cellulaire obtenue en présence de RN 000 et RN 003. Pour ce faire, deux tests différents ont été utilisés, le premier est la coloration HT-IP permettant de détecter et produire des images de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. En effet, les cellules exposées et le contrôle (cellules non exposées) ont été directement colorées dans des puits de culture avec la sonde Hoechst (HT) et l'iodure de propidium (IP) pour identifier les cellules nécrotiques et apoptotiques obtenues comme suite à la nanotoxicité des nanotubes de carbone. Les cellules nécrotiques ou en apoptose tardive peuvent absorber l'iodure de propidium puisque la membrane cellulaire est fragilisée. Les cellules nécrotiques seront de couleur rose-rouge au microscope (**figure 5. E**) alors que celles en apoptose tardive seront également rose-rouge mais elles se différencient des cellules nécrotiques par la condensation de la chromatine au niveau du noyau. Cette condensation peut être identifiée par la présence d'agrégats à l'intérieur de la cellule. En ce qui concerne les cellules en apoptose précoce, ces dernières montrent également une condensation au niveau de leur chromatine, mais seul le colorant HT sera visible puisqu'il s'intercale au niveau de l'ADN du noyau des cellules vivantes. Le noyau montre alors les mêmes bulles à l'intérieur de la cellule mais elles sont bleues et non rose-rouges puisque la cellule n'est pas encore morte (**figure 5. E**). Nos données indiquent que le témoin, représenté par les cellules qui n'ont pas été exposées aux NP, ne contient aucune cellule nécrotique ni apoptotique (pas de condensation de la chromatine visible) (**figure 5. A**). L'exposition des cellules à différentes concentrations de RN 000 ou RN 003 n'a montré aucune apoptose ou de nécrose cellulaire (**figure 5. B-C-D-F-G et H**). Or, cette analyse a indiqué que ni le RN 000 ou le RN 003 n'induisent une mortalité pour les cellules A549, comme indiqué par le test d'exclusion au bleu de trypan (**figure 4**). Cependant, en observant au microscope, un effet marquant s'est produit: en augmentant la concentration de RN 000 et RN 003 (**figure 5. C-D et G-H**), on constate qu'il y a de moins en moins des cellules colorées en bleu, et on peut constater qu'il y

a une diminution de la prolifération cellulaire. Le nombre total des cellules vivantes a été difficile à quantifier avec cette méthode. C'est pour cette raison que la prolifération cellulaire a été étudiée à l'aide du test d'exclusion au bleu de trypan (voir la section 6). Il est à noter que l'exposition des cellules à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PQ (**figure 5. E**), s'est traduite par 50% de noyaux colorés en rose/rouge (nécrose), ce qui confirme les résultats précédents. Il a aussi été possible de visualiser de l'apoptose précoce (voir flèches, **figure 5. E**).

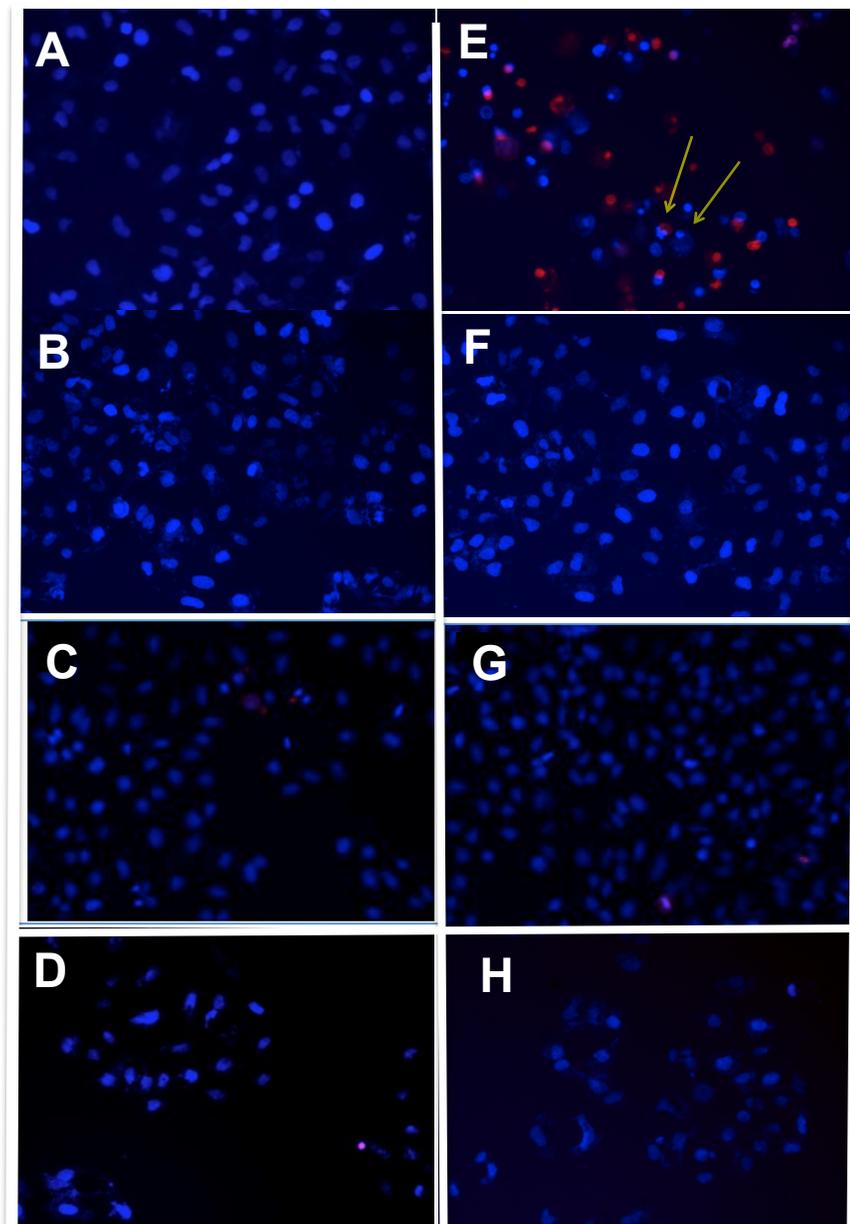


Figure 4. Coloration HT-IP des cellules A549 pour la mise en évidence du type de mortalité cellulaire après une exposition aux NTCSP pendant 24h.

Contrôle (cellules non exposées aux NP) (A), cellules exposées à 10 µg/mL (B), 100 µg/mL (C) et 1000 µg/mL (D) de RN 000 et à 10 µg/mL (F), 100 µg/mL (G) et 1000 µg/mL (H) de RN 003. Contrôle positif (cellules exposées à 100 µg/mL de PQ) (E). L'analyse par microscopie de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = \text{filtre } 360\text{-}425 \text{ nm}$) a été réalisée en utilisant un microscope à épifluorescence Grossissement de 20 X.

5. Étude de l'altération de la viabilité cellulaire par la mesure des corps apoptotiques (*Apoptotic blebs*)

En résumé, à la fois les tests MTS et PrestoBlue® indiquent une diminution de la viabilité cellulaire par RN 000 et RN 003 (**figures 1 et 2**), alors que le test au bleu de trypan et la coloration HT- IP (**figures 3 et 4**) ont montré que les deux NTCSP n'induisent pas une mortalité des cellules A549 humaines, même à des concentrations élevées. Par conséquent, afin de conclure si RN 000 ou RN 003 altère la viabilité des cellules humaines A549, un cinquième essai a été nécessaire. La mesure des corps apoptotiques a été utilisée afin d'étudier le mécanisme de l'altération de la viabilité cellulaire. Les résultats obtenus en cytométrie en flux montrent que l'exposition des cellules aux différents NTC et à des concentrations différentes ne semble pas engendrer l'apoptose ni précoce ni tardive des cellules A549. En effet, il est possible de constater que le pourcentage obtenu dans le quadrant A2 (**figure 5. B, C, E et F**), représentant la population de cellules en apoptose, est similaire à celui obtenu pour le contrôle (**figure 5. A**). Le contrôle positif, représenté par les cellules incubées en présence de camptothécine, montre une population de cellules en apoptose de 50,0% (**figure 5. D**) indiquant que l'absence d'apoptose observée pour les cellules incubées avec les NTCSP n'est pas due à un problème avec le kit utilisé ou à une erreur de manipulation.

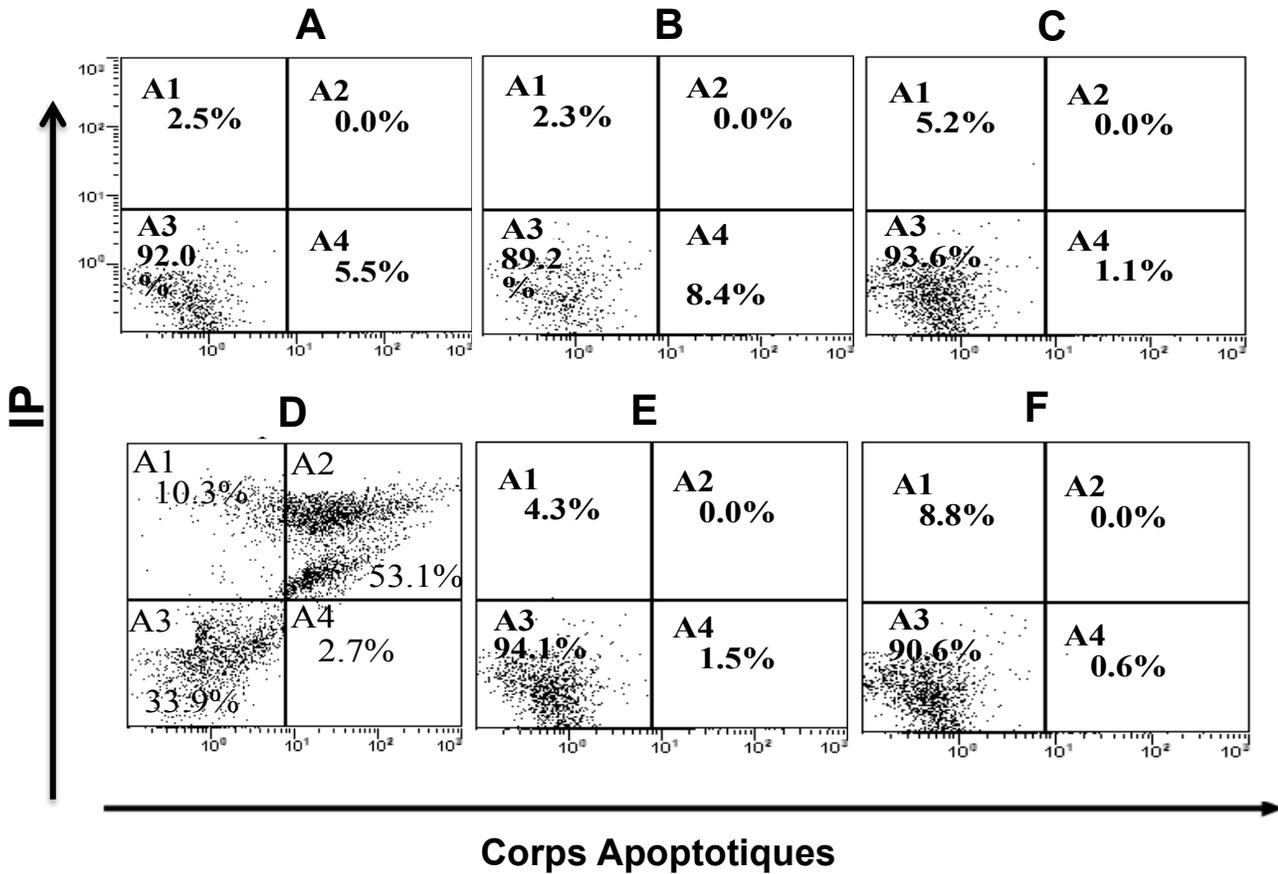


Figure 5. Effets des NTCSP RN 000 et RN 003 sur l'apoptose des cellules A549.

Les cellules ont été incubées pendant 24 heures avec des concentrations de 10 (B) et 500 µg/mL (C) de RN 000 et 10 (E) et 500 µg/mL (F) de RN 003 par la suite elles ont été marquées avec la protéine de fusion scFv, présente à la surface des bulles apoptotiques qui sont détectables lors des phases précoce et tardive de l'apoptose. Les cellules en apoptose sont doublement marquées et se retrouvent dans le quadrant A2 alors que la population de cellules vivantes se retrouve dans le quadrant A3. Le quadrant A4 représente la population de cellules qui exprime la protéine scFv alors que le quadrant A1 représente la population de cellules marquée au IP. Les cellules non exposées aux NP sont représentées en (A) et un contrôle positif (D) représenté par les cellules incubées en présence de camptothécine (4 µg/mL).

La mesure des corps apoptotiques a également fourni des informations importantes. L'analyse de la taille et de la structure interne (ou granularité) des cellules- respectivement FS et SS (**figure 6.A**) - a montré des changements progressifs dans la morphologie des cellules lorsqu'elles sont exposées à RN 000 ou RN 003. Les changements dans la morphologie des cellules ont été quantifiés à l'aide de quatre quadrants nommés A (contenant la majorité des cellules dans l'état initial) et X, Y et W. Comme le montre la **figure 6**, RN 000 et RN 003 induisent de façon concentration-dépendante un changement progressif de la population cellulaire initiale de la fenêtre A à la fenêtre X indiquant que les interactions des deux NTCSP avec des cellules humaines A549 ont induit une diminution de la taille de la cellule (une diminution des valeurs de FS). En effet, lorsqu'on regarde le quadrant A des cellules non exposées aux RN 000, il y a 86,8% de cellules au départ ayant une taille et forme normale et plus la concentration augmente plus le pourcentage des cellules, ayant la taille normale, diminue, baissant jusqu'à 12,5% de cellules (n'ayant aucun changement au niveau de la taille) pour une concentration de 1000 µg/mL de NTCSP. De plus, les résultats avec les deux NTCSP montrent qu'il y a un changement dans les cellules au niveau de la structure interne (augmentation des valeurs SS; quadrant Y) progressive avec l'augmentation de la concentration de RN 000 et RN 003. Dans l'ensemble, nos données indiquent que RN 000 et RN 003 interagissent avec les cellules A549 humaines pour provoquer des changements dans la morphologie des cellules sans induire de toxicité cellulaire, mais il y a un processus de diminution de la prolifération cellulaire tel qu'observé dans la coloration HT-IP (**figure 5. C-D et G-H**).

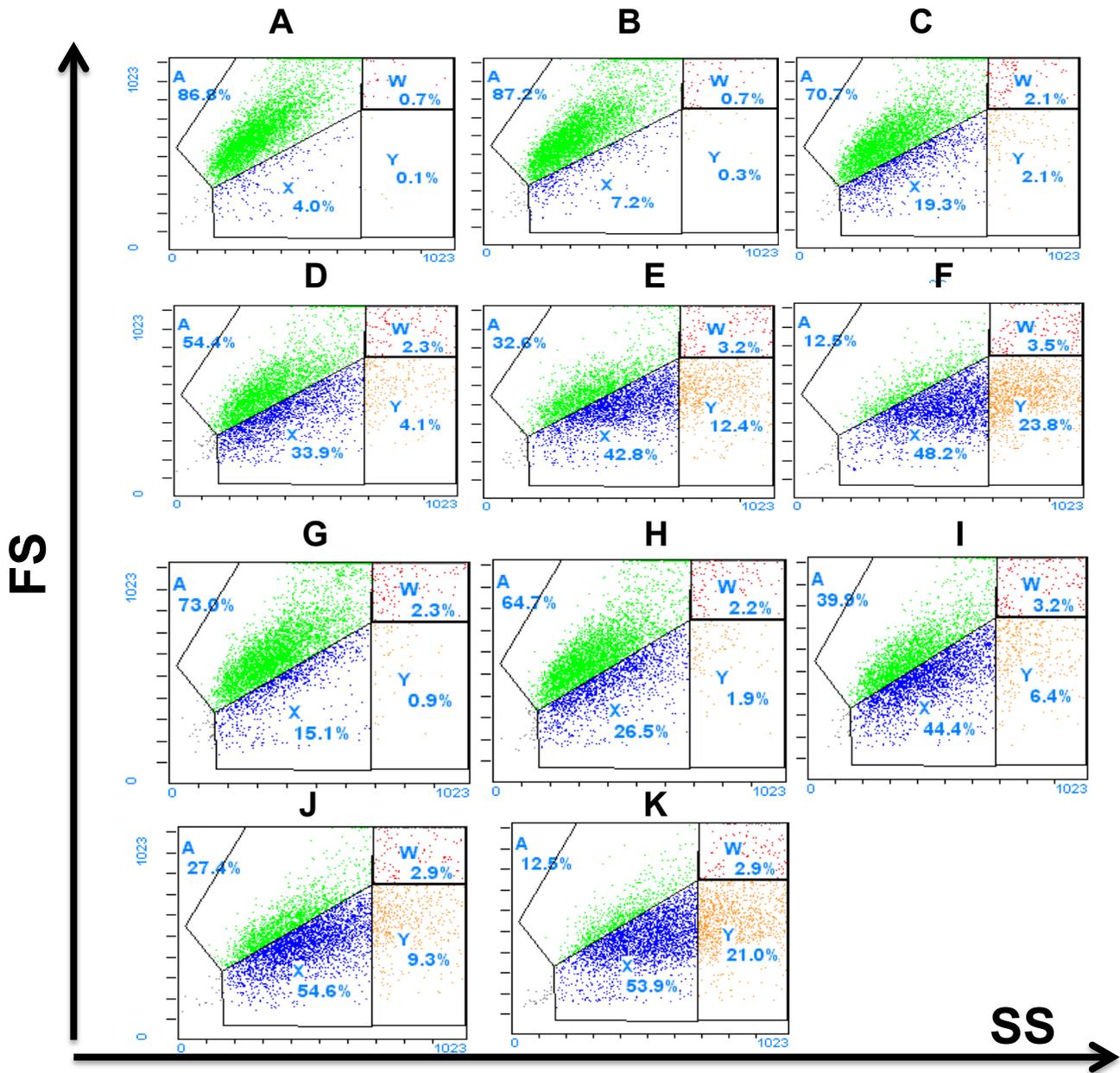


Figure 6. La morphologie des cellules A549 à l'aide de la protéine de fusion scFv liée à la protéine A suite à l'exposition aux NTCSP.

Les cellules ont été incubées pendant 24 heures avec des concentrations de 10 (B), 100 (C), 200 (D), 500 (E) et 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F) de RN 000, et de 10 (G), 100 (H), 200 (I), 500 (J) et 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (K) de RN 003. Par la suite elles ont été marquées avec la protéine de fusion scFv, présente à la surface des bulles apoptotiques qui sont détectables lors des phases précoce et tardive de l'apoptose. Les cellules ont été quantifiées à l'aide de quatre quadrants nommés A (les cellules initiales), W (la taille des cellules; FS), X (l'interaction des cellules avec les NTCSP) et Y (la structure interne des cellules; SS). Les cellules non exposées aux NP sont représentées en (A).

6. Étude de la prolifération cellulaire par le test d'exclusion au bleu de trypan lors de l'exposition de différentes durées aux NTCSP

Nos données indiquent que l'exposition des cellules A549 aux RN 000 et RN 003 de courte durée (24h) n'affecte pas la viabilité cellulaire. Cependant, la coloration HT-IP permet de noter un processus intéressant: la diminution de la prolifération cellulaire. En effet, dans la **figure 7**, il y a une diminution significative de la prolifération d'environ 20% à une concentration de NTCSP de 500 µg/mL et de près de 34% à une concentration de NTCSP de 1000 µg/mL. Afin de déterminer si ce phénomène persiste ou non dans le temps, l'effet de la RN 000 et RN 003 sur la prolifération des cellules humaines A549 a été étudié sur une période de temps de 48h et 72 h. Nos données indiquent que l'exposition des cellules aux NTCSP pendant 48h induit une diminution significative de la prolifération cellulaire d'environ 36% à une concentration de NTCSP de 500 µg/mL et près de 51% à une concentration de NTCSP de 1000 µg/mL (par rapport aux cellules témoins non exposées) (**figure 7**). Afin de mieux évaluer l'évolution temporelle de l'inhibition de la prolifération cellulaire en réponse à l'exposition aux NTCSP, une durée d'exposition de 72h a été examinée. Nos données ont montré que, même à 72h, l'inhibition de la prolifération des cellules est de presque 29% pour une concentration de NTCSP de 500 µg/mL et de près de 57% à une concentration de NTCSP de 1000 µg/mL. En outre, la cinétique de prolifération cellulaire indique que le taux de prolifération des cellules diminue au fur et à mesure lorsqu'elles sont exposées à une longue durée et à une concentration élevée.

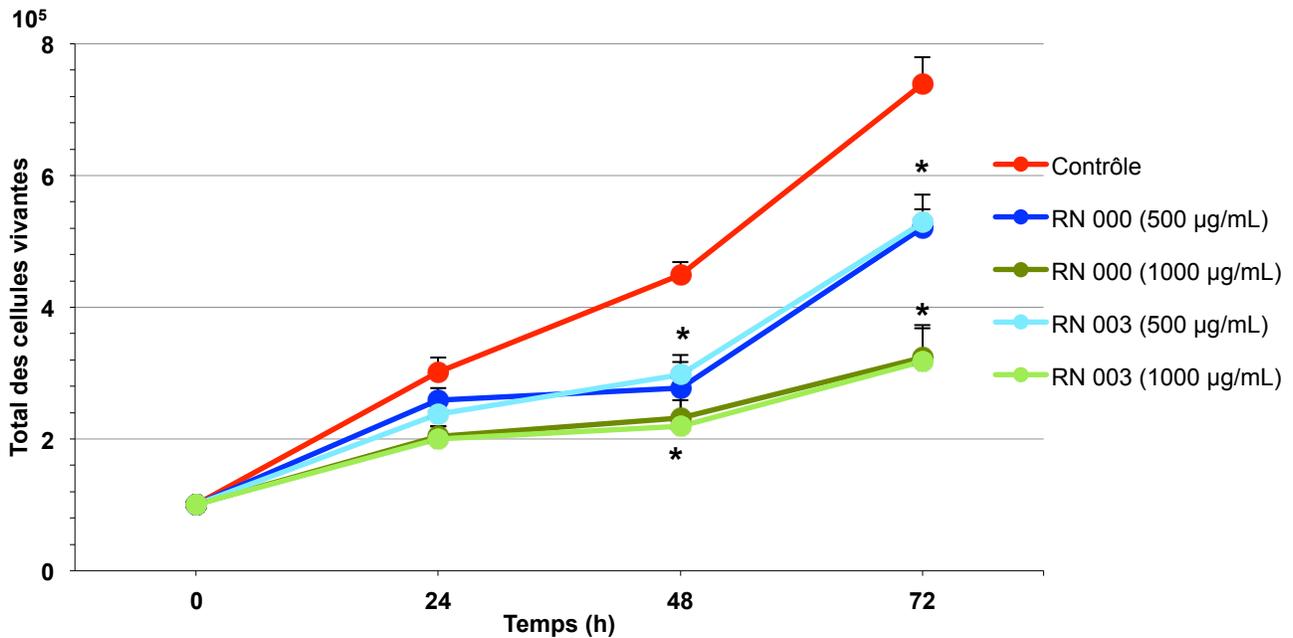


Figure 7. Cinétique de la viabilité cellulaire des A549 exposées aux NTCSP.

Le nombre total des cellules a été déterminé par le test d'exclusion au bleu de trypan à différents temps (24, 48 et 72h) en partant de la même quantité de cellules (100 000). Les cellules ont été exposées à 500, 1000 µg/mL de RN 000 ou de RN 003. Les résultats sont exprimés en MOY ± SEM de sept expériences indépendantes pour chaque concentration. L'analyse des résultats des expériences de cinétique a été effectuée à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs dont le premier facteur était les concentrations des NTCSP : $F(2,126)=99,094$; $p<0,05$ et le deuxième facteur était les différents temps d'exposition : $F(2,126)=130,258$; $p<0,05$. Lorsque l'interaction entre les deux facteurs était significative, une décomposition a été effectuée selon Field. Lorsque le résultat de l'un des facteurs principaux était significatif, une analyse post-hoc a été réalisée en utilisant une correction de Bonferroni afin de déterminer les différences significatives entre les niveaux représentés par l'astérisque : * $p < 0,05$ vs contrôle.

Discussion

Le but de mon projet de recherche était d'étudier la biosécurité des nanotubes de carbone simple paroi (NTCSP) produits à des fins industrielles par la compagnie Raymor. Pour répondre à cet objectif, nous avons utilisé les cellules épithéliales alvéolaires humaines, la lignée A549. Ces cellules ont été exposées à deux types de NTCSP, que la compagnie Raymor nous a fournis : Bruts (RN 000) et dopés à l'azote (RN 003). La démarche expérimentale que nous avons adoptée est tout d'abord d'étudier la viabilité/mortalité cellulaire à l'aide de l'essai MTS, de l'essai PrestoBlue® et du test d'exclusion au bleu de trypan. Ensuite, nous avons utilisé une autre méthode : la coloration HT-IP, afin d'observer au niveau microscopique, le type de mortalité cellulaire. Pour terminer, nous avons ajouté un autre test tel que la mesure des corps apoptotiques afin de valider nos résultats.

Les principaux résultats de cette étude montrent que :

- 1) L'exposition des cellules A549 aux NTCSP montre que la fonction d'oxydoréduction est affectée avec les essais suivants : MTS et PrestoBlue®.
- 2) L'exposition de 24 heures des cellules épithéliales alvéolaires de la lignée A549 aux NTCSP n'entraîne aucune diminution de la viabilité cellulaire, mesuré par le test d'exclusion au bleu de trypan ou la coloration HT/IP, et ceci, quelle que soit la concentration considérée. En revanche, l'exposition des cellules aux PQ (utilisés comme un témoin positif) entraîne une mortalité drastique des cellules dès 24h.
- 3) L'exposition des cellules aux fortes concentrations de NTCSP (500 et 1000 µg/mL) entraîne une diminution de la prolifération cellulaire sans induire la mortalité des cellules.
- 4) L'interaction des NTCSP avec les cellules A549 induit un changement de la morphologie cellulaire ; une diminution de la taille ainsi qu'une augmentation de la structure interne des cellules A549.
- 5) Aucune différence significative n'a été constatée entre les deux NTCSP (RN 000 et RN

003) en terme de viabilité cellulaire, quelle que soit la concentration ou le temps d'exposition considérés.

Discussion des résultats

Les études *in vitro* qui se sont intéressées à la toxicité des NTC ont rapporté une diminution de la viabilité des cellules étudiées dès quelques µg/mL d'exposition aux NTC [Cui et al., 2005 ; Jia et al., 2005 ; Manna et al., 2005 ; Murr & Soto, 2004]. Ainsi, en 2005, Cui et collaborateurs, ont montré que l'incubation des cellules embryonnaires humaines de rein HEK293 avec des faibles concentrations de NTCSP s'est traduite par l'induction de l'apoptose dès 25 µg/mL de NTC. Les résultats de ces études sont à l'opposé de nos données [Cui et al., 2005].

À la suite des corrections des interférences, les deux essais MTS et PrestoBlue® ont indiqué une diminution marquée de la viabilité des cellules lorsque les cellules ont été exposées à RN 003 (**figures 1 et 2**). Cependant, seul l'essai PrestoBlue® a indiqué qu'il y a une diminution de la viabilité cellulaire après exposition au RN 000 à une concentration élevée de 1000 µg/mL (**figure 2**). Il est impossible de déterminer si un essai est plus sensible que l'autre, car l'essai MTS montre qu'il y a plus d'interférences avec ces NTCSP, en particulier avec RN 000. Dans l'ensemble, nos données suggèrent fortement que les deux RN 000 et RN 003 affectent la viabilité des cellules A549 humaines. Cependant, la mortalité induite par ces NTCSP est observée à des concentrations très élevées. Ces résultats contrastent avec les études sur la biosécurité des autres NTCSP dans lesquelles la nanotoxicité est habituellement observée à une concentration inférieure à 1 µg/mL (1000 fois inférieure aux NTCSP de Raymor) [Cui et al., 2005 ; Jia et al., 2005 ; Manna et al., 2005 ; Murr & Soto, 2004]. En revanche, nous avons trouvé une étude dont les résultats sont très semblables aux nôtres [Davoren et al., 2007]. Il y est rapporté qu'il n'y a aucune cytotoxicité significative lors de l'exposition de cellules A549 à des faibles doses, mais une induction significative de la mortalité de 41% et 52% pour des concentrations de 400 et 800 µg/mL évaluée avec les tests MTT et AlamarBlue®. Ces essais ont le même principe : Les test MTS et MTT sont basées sur l'activité déshydrogénase des mitochondries des cellules vivantes. À la mort cellulaire,

l'activité des mitochondries disparaît et donc, avec elle, la capacité de réduction des sels de tétrazolium en formazan.

Ainsi avec l'essai PrestoBlue® et AlamarBlue®, les cellules vivantes convertissent une molécule (Résazurine) en un produit fluorescent (Résorufine) dont la quantité est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. L'ensemble de ces tests évalue la capacité métabolique de la population cellulaire. En effet, le métabolisme des cellules génère des «équivalents réducteurs» sous forme de NADH ou NADPH. Donc les résultats de MTS et PrestoBlue® montrent que le métabolisme est touché. Cependant, ces résultats ne sont pas suffisants et aucune conclusion ne peut être tirée.

Des études ont montré aussi que le test de viabilité cellulaire MTT interfère avec les NTC (tel qu'observé dans la **figure 1.A**) et donne de faux positifs [Casey et al., 2007a; Pulskam et al., 2007; Simon-Deckers, 2008; Wörle-Knirsch et al., 2006]. En réalité, des études plus récentes utilisant des tests de viabilité non controversés, montrent un faible effet cytotoxique des NTC. En effet, pour les cellules alvéolaires A549 exposées à des NTCSP, un maximum de 10 % de mortalité cellulaire est obtenu par le test LDH et encore moins avec le test WST-1 [Wörle-Knirsch et al., 2006]. Donc, puisque l'essai de PrestoBlue® était le seul essai capable de détecter un effet toxique pour RN 000, et afin de confirmer nos résultats sur la toxicité potentielle de ces NTCSP, nous avons effectué à nouveau ces expériences, mais en utilisant cette fois l'exclusion du bleu de trypan pour l'évaluation de la viabilité cellulaire.

Le bleu de trypan est un colorant qui rentre dans les cellules, mais qui entraîne un mécanisme d'exclusion le rejetant dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera le colorant et restera incolore, tandis qu'une cellule morte permettra au colorant de s'infiltrer dans sa membrane plasmique endommagée, la faisant apparaître en bleue. Au microscope optique, les cellules vivantes (blanches) sont donc différenciées des cellules mortes (bleues). En utilisant un hémacytomètre, il est alors possible de déterminer la viabilité cellulaire car cet instrument permet de compter les cellules visuellement dans un volume précis. En ce qui concerne la détermination de la viabilité

cellulaire par l'exclusion du bleu de trypan, nos données indiquent que RN 000 et RN 003 n'ont induit aucune mortalité des cellules humaines A549 (**figure 3**). Cette technique est peu coûteuse et rapide à mettre en place. Dépendamment du manipulateur, le comptage manuel sous microscope est considéré comme étant plus ou moins fiable. Cependant, le comptage, dans notre cas, a été facile, car lors de l'observation il y a eu peu ou aucune cellule bleue. Ensuite, suivant le même principe d'observation avec encore plus de précision pour le type de mortalité, le test de coloration HT-IP a été ajouté afin de voir s'il confirme les tests PrestoBlue® et MTS ou le test d'exclusion du bleu de trypan.

De même, la coloration HT-IP a confirmé les résultats de l'exclusion au bleu de trypan. Tel qu'observé à la **figure 4**, en comparant avec les cellules témoins sans NP (Panel A), nous n'observons pas de mortalité cellulaire à des concentrations de 10, 100 et 1000 µg/mL de RN 000 et RN 003 (Panel B-C-D-F-G-H). En effet, les cellules sont majoritairement toutes bleues grâce au HT qui colore les cellules vivantes. Par contre, nous observons que dans les cellules exposées aux PQ (Panel D), l'IP a coloré en rouge une grande majorité des cellules, car ces dernières ont perdu leur intégrité membranaire. Cependant à 1000 µg/mL (Panel D et H), il y a une grande diminution de la prolifération cellulaire pour les deux types de NTCSP.

De plus, avec l'exclusion au bleu de trypan, les cellules A549 ont été exposées aux NTCSP pendant 48 et 72h. Bien que les données ne soient pas présentées sous cette forme, la viabilité des cellules A549 exprimée en pourcentage par rapport aux cellules mortes ne montre aucune mortalité cellulaire avec les deux types de NTCSP quel que soit la concentration utilisée pendant 48 et 72h. Cependant, avec l'évolution temporelle, il y a observation de l'inhibition significative de la prolifération cellulaire à long terme telle que vu dans la coloration HT-IP à 24h d'exposition. Avec le test d'exclusion au bleu de trypan, il y a diminution de la prolifération cellulaire, mais qui n'est pas significative (à 24h). En effet, en partant, nous avons en partant, 10^5 cellules. Nous savons que la division des cellules A549 se fait au 22 heures environ. Nous observons, dans le cas du témoin, environ 3×10^5 , 4.5×10^5 et 7.5×10^5 cellules, respectivement à 24, 48 et 72h. RN 000 et RN 003 ont un effet très similaire sur les cellules A549. À partir de 500 µg/mL, il y a déjà une diminution de la viabilité cellulaire. En effet, l'exposition des cellules aux NTCSP pendant 48h et 72h induit une

diminution significative de la prolifération cellulaire respectivement d'environ 36% et 29% à une concentration de NTCSP. De plus, à une concentration de 1000 µg/mL, il y a environ 2×10^5 cellules pendant 48h et environ 3×10^5 pendant 72h. Donc nous pouvons conclure que la croissance des cellules A549 a été inhibée (**figure 7**).

Les résultats obtenus avec la coloration HT-IP ont confirmé l'exclusion au bleu de trypan, que les NTCSP n'ont aucun effet sur la viabilité cellulaire, indépendamment de la concentration employée ou de la durée de l'exposition. De plus, le fait que RN 003 est dopée avec l'azote n'a rien changé et l'effet reste similaire au RN 000.

Par contre, nous avons vu une diminution de la prolifération cellulaire. Ceci peut être dû au manque d'accessibilité des nutriments présents dans le milieu de culture [Casey et al., 2008], en raison de l'effet d'agrégation des NTCSP [Simon-Deckers, 2008]. L'absence d'effets des NTCSP sur les cellules A549 que nous avons rapportées, pourrait aussi être attribuée à l'agent dispersant (ici la BSA) [Dutta et al., 2007]. En effet, Dutta et collaborateurs, ont montré que l'albumine est la protéine contenue dans le sérum qui se fixe préférentiellement sur les NTC. Une explication probable serait que l'albumine interagisse avec le NTCSP l'empêchant d'exercer ses effets toxiques. Cependant, la concentration de l'albumine que nous avons utilisée pour disperser les NTCSP (0,5 mg/ml) avant la dilution dans le milieu de culture, est environ 100 fois inférieures à celle présente en condition physiologique au niveau du surfactant pulmonaire d'un rongeur (ex. Le rat soit 45 mg/mL). Ainsi, la quantité d'albumine ajoutée lors de la mise en suspension de la particule peut être considérée comme négligeable. Une autre possibilité serait que la toxicité des NTCSP dépend du type cellulaire. La lignée A549 utilisée dans cette étude fait partie du groupe de cellules transformées et immortalisées. Il serait donc intéressant de tester les NTCSP sur des cellules primaires telles que les BEAS-2B.

Au niveau de la viabilité cellulaire, les deux NTCSP ne semblent pas être différents. Les deux NTCSP : RN 000 et RN 003 contiennent les mêmes catalyseurs : yttrium et nickel. Le choix des catalyseurs se justifie par le fait que le carbone amorphe se transforme en graphite à environ 2500- 3500°C. Or, pour accélérer cette réaction à une basse température le carbone doit être en contact avec un catalyseur. Des études ont montré que les meilleurs

catalyseurs pour cette graphitisation sont : cobalt, fer et nickel. Il se peut qu'il y ait une différence au niveau des propriétés physiques. La seule différence entre ces deux NTCSP est que le RN 003 est dopé à l'azote. En 1989, des études théoriques ont démontré que les matériaux carbonés dopés à l'azote possédaient des propriétés mécaniques intéressantes [Liu et Cohen, 1990]. En effet, des calculs par Mattesini et al. ont prédit que les solides covalents formés d'atomes de carbone et d'azote possèderaient des propriétés physiques exceptionnelles : dureté de l'ordre de diamant, caractère de semi-conducteur à grand gap et une forte conductivité thermique [Mattesini et al., 2000]. Cependant, une étude a montré qu'il est difficile d'incorporer de l'azote dans les feuillets graphitiques et que les taux de dopage n'excèdent pas les 20% [Glerup et al., 2003]. Lors du procédé d'incorporation de l'azote, trois paramètres jouent un rôle important: la nature du catalyseur, celle du précurseur organique et celle des gaz réactifs. Quelle que soit la méthode de synthèse, l'utilisation du catalyseur fer ou cobalt donne un taux de dopage important (20% maximum) alors qu'il devient presque négligeable dans le cas du nickel (6% maximum) [Glerup et al., 2003]. Or c'est peut-être pour cela que RN 003 ne semble pas avoir un effet distinct du RN 000 au niveau de la viabilité cellulaire.

L'inhibition de la prolifération a été un fait important dans les résultats. Cependant, un autre fait intéressant a été observé : le changement de la morphologie des cellules A549. Ainsi, la mesure des corps apoptotiques a été effectuée pour trancher entre les résultats contradictoires suivants: diminution (MTS et PrestoBlue®) ou absence d'effet sur la viabilité cellulaire (coloration HT-IP et bleu de trypan). Il s'agit une méthode de quantification par cytométrie en flux où on utilise des anticorps qui sont couplés à un fluorochrome. Puis l'outil analyse le profil de fluorescence des cellules étudiées pour indiquer si elles subissent l'apoptose ou pas. Dans la **figure 5**, la mesure des corps apoptotiques confirme l'exclusion au bleu de trypan ainsi que la coloration HT-IP. En effet, il n'y a pas de mortalité cellulaire, mais dans la **figure 6**, les cellules A549 subissent un changement au niveau de la structure : diminution de la taille et augmentation de la granularité. Tout d'abord, pour bien comprendre ce changement, il serait intéressant de vérifier par microscopie électronique s'il y a une internalisation des NTCSP dans les cellules ou les vésicules. Des études montrent que les NTC

sont accumulés essentiellement dans des vésicules chez les cellules A549. Cette accumulation a lieu dès 4h d'exposition et elle est influencée par la taille des NTC. Après une exposition des cellules A549 à 400 et à 800 µg/mL, M. Davoren et al. ont observé, en microscopie électronique de transmission, une augmentation de corps lamellaires et de corps multivésiculaires [Davoren et al., 2007].

Il faut aussi noter que les cellules A549 ont retenu le rôle principal du surfactant pulmonaire qui est la régulation de la tension de surface dans les poumons [Nicholas, 1996] et que la production accrue de ce tensioactif peut jouer un rôle dans la défense des poumons contre les dommages chimiques [Hook 1991, 1993]. M. Davoren et al. ont conclu que le changement de morphologie des cellules exposées observé dans leur étude serait dû à l'augmentation de la quantité de surfactant stocké dans les corps lamellaires. Or ces auteurs supposent donc que la présence accrue de ces corps lamellaires pourrait être une réponse défensive de ces cellules pulmonaires aux NTCSP [Davoren et al., 2007].

Conclusion et perspectives

De plus, il y a des études comme celle de l'équipe de Wörle-Knirsch qui a rapporté que les NTCSP peuvent être trouvés sous forme de faisceaux à l'intérieur des cellules A549. Ces auteurs ont postulé qu'ils étaient pour la plupart encapsulés dans les endosomes et peu fréquemment trouvés à l'intérieur des mitochondries [Wörle-Knirsch et al., 2006]. Avec l'équipe de Dr Maghni, dû aux résultats obtenus tels que : la fonction oxydoréduction affectée, diminution de la prolifération cellulaire, changement de la morphologie, nous postulons, comme indiqué plus haut que le métabolisme est touché. La mitochondrie semble être l'élément commun qui réunit l'ensemble de ces résultats. Nos hypothèses sont les suivantes :

- 1) l'interaction de ces nanoparticules avec les mitochondries altère la fonctionnalité de ces organites intracellulaires.
- 2) cette altération est potentiellement irréversible.

Il serait intéressant d'étudier les NTCSP provenant de Raymor afin de répondre à ces hypothèses en utilisant ces diverses approches méthodologiques:

- Isolation des mitochondries (utilisation du «Qproteome Mitochondria Isolation kit)
- Détermination de la pureté des mitochondries isolées (mesure qualitative de la pureté de la fraction mitochondriale) par la technique d'immunobuvardage de type western pour la détection respective des protéines calnexine (marqueur du réticulum endoplasmique), GAPDH (marqueur du cytosol) et TOM20 (marqueur mitochondrial)
- La détermination de la fonctionnalité des mitochondries isolées serait effectuée par la mesure de l'activité mitochondriale et la mesure de l'activité de citrate synthase.
- L'altération de l'expression de gènes spécifiques à la mitochondrie serait aussi déterminée par la technique de qRT-PCR.

L'étude de l'existence d'une altération de la fonction mitochondriale par les nanotubes de carbone est un mécanisme important à établir afin de mieux comprendre les conséquences physiopathologiques associées à l'exposition à ces nanoparticules. En effet, plusieurs maladies sont associées au dysfonctionnement de la mitochondrie telles que l'asthme, la fibrose kystique, le cancer du poumon, l'hypertension artérielle pulmonaire, l'encéphalomyopathie mitochondriale, l'insulino-résistance musculaire, etc. [Sureshababu & Bhandari, 2013].

Plusieurs points restent à explorer, afin de valider nos résultats, il serait intéressant :

- 1) d'étudier *in vitro* d'autres types de cellules telles que, les cellules primaires les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales bronchiques, les cellules cutanées, etc.
- 2) d'analyser les mécanismes de la nanotoxicité;
 - d'étudier la réponse inflammatoire par le dosage des cytokines comme l'IL-8, un chémoattractant pour les neutrophiles, ou le GM-CSF (*granulocyte macrophage*

colony stimulating factor) ; ces cytokines sont synthétisées par les cellules épithéliales lorsqu'elles sont exposées à des particules ultrafines de la pollution atmosphérique.

- d'étudier le stress oxydant par le dosage de glutathion

- 3) de faire des analyses d'internalisation cellulaire des NTCSP à l'aide de la microscopie électronique ;

- 4) enfin, de réaliser des études *in vivo* qui seraient aussi importantes que les études aux niveaux cellulaire et sous-cellulaire (par exemple avec des modèles murins).

Bibliographie

Al Faraj, A., Bessaad, A., Cieslar, K., Lacroix, G., Canet-Soulas, E., & Crémillieux, Y. (2010). Long-term follow-up of lung biodistribution and effect of instilled SWCNTs using multiscale imaging techniques. *Nanotechnology*, *21*(17), 175103.

Auplat, C., & Delemarle, A. (2013). Mieux comprendre les nouvelles opportunités liées aux nanotechnologies. *Entreprendre & innover*, *16*(4), 64-77.

Bergeron-Prévost, M. (2015). Nanotoxicité des points quantiques: étude in vitro chez les cellules épithéliales alvéolaires humaines A549. (Mémoire de maîtrise, Université de Montréal). Repéré à <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/12106>

Bergin, I. L., & Witzmann, F. A. (2013). Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *International journal of biomedical nanoscience and nanotechnology*, *3*(1-2), 163-210.

Bethune, D. S., Klang, C. H., De Vries, M. S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., & Beyers, R. (1993). Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature*, *365*, 605-607.

Bussy, C., Cambedouzou, J., Lanone, S., Leccia, E., Heresanu, V., Pinault, M., ... & Launois, P. (2008). Carbon nanotubes in macrophages: imaging and chemical analysis by X-ray fluorescence microscopy. *Nano letters*, *8*(9), 2659-2663.

Casey, A., Herzog, E., Lyng, F. M., Byrne, H. J., Chambers, G., & Davoren, M. (2008). Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicology letters*, *179*(2), 78-84.

Che, G., Lakshmi, B. B., Martin, C. R., Fisher, E. R., & Ruoff, R. S. (1998). Chemical vapor deposition based synthesis of carbon nanotubes and nanofibers using a template method. *Chemistry of Materials*, *10*(1), 260-267.

Chou, C. C., Hsiao, H. Y., Hong, Q. S., Chen, C. H., Peng, Y. W., Chen, H. W., & Yang, P. C. (2008). Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. *Nano Letters*, *8*(2), 437-445.

Cui, D., Tian, F., Ozkan, C. S., Wang, M., & Gao, H. (2005). Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicology letters*, *155*(1), 73-85.

Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H. J., & Lyng, F. M. (2007). In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology in vitro*, *21*(3), 438-448.

- De Volder, M. F., Tawfick, S. H., Baughman, R. H., & Hart, A. J. (2013). Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*, 339(6119), 535-539.
- Dumortier, H., Lacotte, S., Pastorin, G., Marega, R., Wu, W., Bonifazi, D., ... & Bianco, A. (2006). Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano letters*, 6(7), 1522-1528.
- Dutta, D., Sundaram, S. K., Teeguarden, J. G., Riley, B. J., Fifield, L. S., Jacobs, J. M., ... & Weber, T. J. (2007). Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicological Sciences*, 100(1), 303-315.
- Eatemadi, A., Daraee, H., Karimkhanloo, H., Kouhi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., ... & Joo, S. W. (2014). Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale research letters*, 9(1), 393.
- Elgrabli, D. (2008). Toxicité et clairance pulmonaires des nanotubes de carbone (Thèse de Doctorat, Université Paris-Diderot-Paris VII). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00347713v1>
- Fatissou, J., Hallé, S., Nadeau, S., Viau, C., Camus, M., Ateme-Nuema, B., Cloutier, Y. (2013). *Nanoparticules synthétiques – Gestion adaptative des risques à la santé et à la sécurité des travailleurs* (Rapport n° R-798). Montréal : Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail.
- Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and science*, 23(5), 22-36.
- Field, A. (2009). *Discovering statistics using SPSS*. (3e éd.). London: SAGE Publications Ltd.
- Glerup, M., Castignolles, M., Holzinger, M., Hug, G., Loiseau, A., & Bernier, P. (2003). Synthesis of highly nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes. *Chemical Communications*, (20), 2542-2543.
- Globus, A., Bailey, D., Han, J., Jaffe, R., Levit, C., Merkle, R., & Srivastava, D. (1998). Nasa applications of molecular nanotechnology. *Journal of the British Interplanetary Society*, 51, 145-152.
- Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J., & Hecht, S. M. (1989). On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*, 28(11), 4629-4638.
- Hinkov, I., Diankov, S., & Tchaoushev, S. (2010). Évaluation des risques liés aux nanotubes de carbone. *Revue de Génie Industriel*, 5, 20-24.
- Hook, G. E. (1991). Alveolar proteinosis and phospholipidoses of the lungs. *Toxicologic pathology*, 19(4-1), 482-513.

- Hook, G. E. (1993). Does pulmonary surfactant aid in defense of the lungs?. *Environmental health perspectives*, 101(2), 98.
- Huczko, A., & Lange, H. (2001). Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Fullerene Science and Technology*, 9(2), 247-250.
- Huczko, A., Lange, H., Bystrzejewski, M., Baranowski, P., Grubek-Jaworska, H., Nejman, P., ... & Kroto, H. W. (2005). Pulmonary Toxicity of 1-D Nanocarbon Materials. *Fullerenes, nanotubes, and carbon nanostructures*, 13(2), 141-145.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354(6348), 56-58.
- Kim, E. S. (2008). Directed evolution: A historical exploration into an evolutionary experimental system of nanobiotechnology, 1965–2006. *Minerva*, 46(4), 463-484.
- Lam, C. W., James, J. T., McCluskey, R., & Hunter, R. L. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences*, 77(1), 126-134.
- Liu, A. Y., & Cohen, M. L. (1990). Structural properties and electronic structure of low-compressibility materials: β -Si₃N₄ and hypothetical β -C₃N₄. *Physical Review B*, 41(15), 10727.
- Lovrić, J., Bazzi, H. S., Cuie, Y., Fortin, G. R., Winnik, F. M., & Maysinger, D. (2005). Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine*, 83(5), 377-385.
- Mangum, J. B., Turpin, E. A., Antao-Menezes, A., Cesta, M. F., Bermudez, E., & Bonner, J. C. (2006). Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages in situ. *Part Fibre Toxicol*, 3, 1-15.
- Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Pulmonary toxicity and fibrogenic response of carbon nanotubes. *Toxicology mechanisms and methods*, 23(3), 196-206.
- Manna, S. K., Sarkar, S., Barr, J., Wise, K., Barrera, E. V., Jejelowo, O., ... & Ramesh, G. T. (2005). Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor- κ B in human keratinocytes. *Nano letters*, 5(9), 1676-1684.
- Mattesini, M., Matar, S. F., & Etourneau, J. (2000). Stability and electronic property investigations of the graphitic C₃N₄ system showing an orthorhombic unit cell. *J. Mater. Chem.*, 10(3), 709-713.

- Mostofizadeh, A., Li, Y., Song, B., & Huang, Y. (2011). Synthesis, properties, and applications of low-dimensional carbon-related nanomaterials. *Journal of nanomaterials*, 2011(16), 1-21.
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J. F., Delos, M., ... & Lison, D. (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and applied pharmacology*, 207(3), 221-231.
- Mueller, N. C., & Nowack, B. (2008). Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental science & technology*, 42(12), 4447-4453.
- Murr, L. E., & Soto, K. F. (2004). TEM comparison of chrysotile (asbestos) nanotubes and carbon nanotubes. *Journal of Materials Science*, 39(15), 4941-4947.
- Nicholas, T. E. (1996). Pulmonary surfactant: no mere paint on the alveolar wall. *Respirology*, 1(4), 247-257.
- Nikolaev, P. (2004). Gas-phase production of single-walled carbon nanotubes from carbon monoxide: a review of the HiPco process. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 4(4), 307-316.
- Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C., Ménard, L., & Trottier, M. (2008b). *Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules* (Rapport n° R-558). Montréal : Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail.
- Parish, A. (2011). *Production and Application of Carbon Nanotubes, Carbon Nanofibers, Fullerenes, Graphene and Nanodiamonds: a Global Technology Survey and Market Analysis*. Stanford : Innovative Research and Products Inc.
- Parks, A. N., Portis, L. M., Schierz, P. A., Washburn, K. M., Perron, M. M., Burgess, R. M., ... & Ferguson, P. L. (2013). Bioaccumulation and toxicity of single-walled carbon nanotubes to benthic organisms at the base of the marine food chain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(6), 1270-1277.
- Poland, C. A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W. A., Seaton, A., ... & Donaldson, K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology*, 3(7), 423-428.
- Pras, M. (2013). Influence de l'état de dispersion de nanotubes de carbone sur leur relargage et aérosolisation lors de la sollicitation tribologique de nanocomposites MWNT/polymère (Thèse de doctorat, INSA de Lyon). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00961261/>
- Pulskamp, K., Diabaté, S., & Krug, H. F. (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology letters*, 168(1), 58-74.

Rafique, M. M. A., & Iqbal, J. (2011). Production of carbon nanotubes by different routes-a review. *Journal of encapsulation and adsorption sciences*, 1(02), 29.

Ricaud, M., Lafon, D., & Roos, F. (2008). Les nanotubes de carbone: quels risques, quelle prévention. *Hygiène et Sécurité au Travail, Institut national de recherche et de sécurité*, 210, 43-57.

Sargent, L. M., Shvedova, A. A., Hubbs, A. F., Salisbury, J. L., Benkovic, S. A., Kashon, M. L., ... & Reynolds, S. H. (2009). Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. *Environ Mol Mutagen*, 50(8), 708-717.

Sato, Y., Yokoyama, A., Shibata, K. I., Akimoto, Y., Ogino, S. I., Nodasaka, Y., ... & Tohji, K. (2005). Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Molecular BioSystems*, 1(2), 176-182.

Sayes, C. M., Marchione, A. A., Reed, K. L., & Warheit, D. B. (2007). Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. *Nano letters*, 7(8), 2399-2406.

Scott, C. D., Arepalli, S., Nikolaev, P., & Smalley, R. E. (2001). Growth mechanisms for single-wall carbon nanotubes in a laser-ablation process. *Applied Physics A*, 72(5), 573-580.

Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Mercer, R., Murray, A. R., Johnson, V. J., Potapovich, A. I., ... & Baron, P. (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(5), L698-L708.

Shvedova, A. A., Murray, A. R., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Kagan, V. E., Gandelsman, V. Z., & Castranova, V. (2003). Exposure to carbon nanotube material: Evidence of exposure-induced oxidant stress in human keratinocyte and bronchial epithelial cells. *In Free Radical Research*, 37,97.

Shvedova, A., Castranova, V., Kisin, E., Schwegler-Berry, D., Murray, A., Gandelsman, V., ... & Baron, P. (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *Journal of toxicology and environmental health Part A*, 66(20), 1909-1926.

Simon-Deckers, A. (2008). Biological effects of manufactured nanoparticles: influence of their characteristics (Thèse de doctorat, INSA de Lyon). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/pastel-00004918/>

Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., van Berlo, D., Höhr, D., ... & Schins, R. P. (2007). Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and applied pharmacology*, 222(2), 141-151.

Sureshababu, A., & Bhandari, V. (2013). Targeting mitochondrial dysfunction in lung diseases: emphasis on mitophagy. *Frontiers in physiology*, 4, 384.

Sutariya, V. B., & Pathak, Y. (2014). *Biointeractions of Nanomaterials*. Florida : CRC Press.

Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., ... & Kanno, J. (2008). Induction of mesothelioma in p53^{+/-}-mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *The Journal of toxicological sciences*, 33(1), 105-116.

Wang, H., Koleilat, G. I., Liu, P., Jiménez-Osés, G., Lai, Y. C., Vosgueritchian, M., ... & Bao, Z. (2014). High-Yield Sorting of Small-Diameter Carbon Nanotubes for Solar Cells and Transistors. *ACS nano*, 8(3), 2609-2617.

Webster, T. J. (2007). IJN's second year is now a part of nanomedicine history!. *International journal of nanomedicine*, 2(1), 1-2.

Wörle-Knirsch, J. M., Pulskamp, K., & Krug, H. F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano letters*, 6(6), 1261-1268.

Zhang, L. W., Zeng, L., Barron, A. R., & Monteiro-Riviere, N. A. (2007). Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes. *International Journal of Toxicology*, 26(2), 103-113.