









Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/21350>

Official URL: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/innovation-th10/nanosciences-concepts-caracterisation-et-aspects-securite-42194210/toxicite-des-nanotubes-de-carbone-envers-l-homme-et-l-environnement-nm8155/>

To cite this version:

Flahaut, Emmanuel  and Evariste, Lauris  and Gauthier, Laury 
and Larue, Camille  and Liné, Clarisse  and Meunier, Etienne
and Mouchet, Florence  *Toxicité des nanotubes de carbone envers
l'homme et l'environnement.* (2018) Techniques de l'Ingénieur. 1-34.

Any correspondence concerning this service should be sent
to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

Toxicité des nanotubes de carbone envers l'homme et l'environnement

Toxicity of Carbon Nanotubes towards Human and the Environment

par **Emmanuel FLAHAUT**

Docteur, Directeur de Recherche CNRS

CIRIMAT, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5085, Toulouse, France

et **Lauris EVARISTE**

Docteur

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

et **Laury GAUTHIER**

Docteur, Maître de Conférences Université Paul Sabatier Toulouse

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

et **Camille LARUE**

Docteur, Chargée de recherche CNRS

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

et **Clarisse LINE**

Doctorante

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

et **Etienne MEUNIER**

Docteur, Chargé de recherche CNRS

IPBS, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS N°5089, Toulouse, France

et **Florence MOUCHET**

Docteur, Ingénieure de recherche CNRS

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

Résumé (~500 - 700 signes) : Résumé du texte - Résumé du texte

Du fait d'un nombre grandissant d'applications commerciales des nanotubes de carbone, les questions relatives à leur impact potentiel sur la santé humaine et sur l'environnement sont toujours d'actualité et font encore l'objet de recherches très actives. Cet article fait le point sur les connaissances actuelles en prenant en compte la diversité des nanoparticules qui se cachent sous la dénomination générale de "nanotubes de carbone". Il ambitionne de traiter la question de manière générale, de l'échelle cellulaire, sur cultures *in vitro*, à l'échelle complexe de l'écosystème par des approches simplifiées en micro et mésocosmes, notamment.

Abstract (~500 – 700 signs): Text abstract - Text abstract

*Due to the growing number of commercial applications of carbon nanotubes, the question of their potential impact on both human health and the environment is still a topical issue and is the focus of a very active field of research. This article is an updated review of the current knowledge, and considers the wide range of the different nanoparticles called "carbon nanotubes". It aims to discuss the question in a very general way, from *in vitro* cell cultures to the complex scale of ecosystems with the use of simplified laboratory approaches such as micro- and mesocosms.*

Mots-clés (~ 3-4) :

Nanomatériaux carbonés ; Impact environnemental ; Santé Toxicité

Keywords (~ 3-4) :

Carbon nanomaterials; Environmental impact; Health; Toxicity

Table des matières

1	<i>Les nanotubes de carbone</i>	3
1.1	Influence des caractéristiques morphologiques et physico-chimiques	4
1.2	Aspects analytiques : détection et quantification dans des matrices organiques	5
2	<i>Impact des NTC sur la santé</i>	6
2.1	Interactions avec le système pulmonaire	8
2.2	Interactions avec le compartiment cutané	10
2.3	Importance de l'environnement sur les effets toxiques des NTC	11
2.4	Bio persistance et élimination	11
3	<i>Impact environnemental</i>	11
3.1	Compartiment terrestre	12
3.1.1	Interactions avec les microorganismes du sol	12
3.1.2	Interactions avec les macro-organismes du sol	13
3.1.3	Interactions avec les végétaux terrestres	13
3.2	Compartiment aquatique	15
3.2.1	Interactions avec les microorganismes (algues et bactéries)	16
3.2.2	Interactions avec les invertébrés aquatiques	17
3.2.3	Interactions avec les vertébrés aquatiques	18
3.3	Vers l'utilisation des micro/mésocosmes	19
4	<i>Conclusion</i>	20
	<i>Glossaire</i>	21
	<i>Sigles, notations et symboles</i>	24
	<i>Bibliographie</i>	26

Introduction

Les nanotubes de carbone (NTC) sont dans l'idéal décrits par l'enroulement sur lui-même d'un feuillet de graphène (une des couches dont la superposition forme le graphite). Leur faible diamètre (de 0,5 nm pour les plus fins à quelques dizaines de nanomètres pour les plus larges) associé à leur longueur pouvant aller du micron à quelques centimètres dans les cas les plus extrêmes, leur confèrent un facteur de forme très élevé et les classent dans la catégorie des nanomatériaux monodimensionnels. Ils peuvent comporter un ou plusieurs tubes concentriques et l'on parle alors de NTC monoparoi (ou monofeuillet) ou multiparoi (ou multifeuillet).

Il est hasardeux de fournir des données économiques précises concernant la production et l'utilisation des NTC au niveau industriel puisque les sources fiables sont rares et que les données des fabricants sont le plus souvent exprimées en capacité de production, ce qui peut être très différent des quantités réellement produites et commercialisées. Des inventaires institutionnels, tels que par exemple celui du Woodrow Wilson Institute [1], proposent des exemples de produits disponibles sur le marché et déclarés comme contenant des NTC, ou soupçonnés d'en contenir. De nombreux rapports de consultants industriels (qui recyclent généralement les mêmes données dont les sources ne sont ni dévoilées ni vérifiables) décrivent cependant un marché florissant et en constante expansion. Dans les faits, les NTC sont très utilisés dans les domaines de l'énergie (batteries rechargeables), des matériaux composites (dont le secteur automobile), et des peintures. Ils sont généralement utilisés en faible proportion dans ces produits, mais leur commercialisation à grande échelle laisse

supposer au final la production à des tonnages importants. La France a été précurseur avec l'obligation de déclaration annuelle, depuis 2013, de "la fabrication, importation ou production des substances à l'état nanoparticulaire", et avec la création de la base R-Nano [2] qui rassemble les données issues de ces déclarations. Bien que les données de la base soient protégées par des accords de confidentialité, un rapport annuel permet par exemple de suivre depuis cette date l'évolution de la production et des usages des nanomatériaux en général. La question de l'impact sur la santé se pose essentiellement au niveau des travailleurs, qui sont dans les faits les seuls à être potentiellement exposés aux NTC tels que fabriqués. En effet, une fois incorporés dans des produits de grande consommation, les risques d'exposition des utilisateurs sont très faibles en conditions normales d'usage, puisque les NTC sont encapsulés dans des matrices, ou tout simplement inaccessibles pour l'utilisateur. A notre connaissance, il n'existe en effet aucune application actuellement sur le marché dans laquelle des NTC seraient en contact direct avec l'homme comme cela pourrait être le cas en cosmétique, dans l'alimentaire (directement dans les aliments ou dans des emballages alimentaires), ou encore dans le domaine de la santé, même si beaucoup de travaux de recherche ont été publiés sur ce sujet. Une libération progressive en cas d'usure "normale" de produits en contenant ne peut pas être exclue, si les conditions d'usage s'y prêtent [3]. La fin de vie des nanomatériaux n'étant pas soumise à une réglementation particulière, une libération progressive dans l'environnement après mise en décharge par exemple, est envisageable. Dans ce cas, avec une contamination attendue de tous les compartiments environnementaux, c'est finalement la population générale qui pourra être exposée indirectement par ce biais, même si cela se produira *a priori* à bien plus longue échéance et surtout avec une exposition à des NTC aux caractéristiques probablement fort éloignées de celles des NTC initialement incorporés dans les produits incriminés (enrobage par des matrices, fonctionnalisation non-covalente par la matière organique naturelle, etc.). Les concentrations alors présentes dans l'environnement seraient extrêmement faibles même si elles pourraient localement (contamination accidentelle liée à un accident de transport, accumulation locale du fait de conditions particulières) être plus importantes. Il faut mentionner que dans le cas des nanotubes de carbone, l'incinération est *a priori* une méthode permettant leur élimination totale puisqu'ils brûlent intégralement à la température d'un incinérateur d'ordures ménagères par exemple. Cependant, en conditions dégradées, une combustion incomplète d'un nanocomposite à matrice polymère contenant des NTC pourrait conduire à un relargage de NTC dans les fumées [4])

L'objet de cet article n'est pas de présenter en détails les NTC dont les propriétés extraordinaires (mécaniques, électriques, thermiques), et les multiples applications ont déjà été décrites et ont déjà fait l'objet de plusieurs dizaines d'articles dans les Techniques de l'Ingénieur. Le choix est fait ici de se focaliser sur les aspects liés à l'impact potentiel des NTC sur la santé et sur l'environnement, en proposant une mise à jour des connaissances sur ces questions dans ces deux domaines.

1 Les nanotubes de carbone

Une difficulté rencontrée lors de l'étude de l'impact des nanotubes de carbone est liée au fait que ces derniers sont considérés comme un seul type de nanoparticules, alors qu'il s'agit en réalité plutôt d'une famille de nanoparticules. Ces derniers peuvent en effet varier non seulement en termes de diamètre et de longueur mais aussi de nombre de paroi et de microstructure. Dans la plupart des cas, les NTC sont constitués d'un ou plusieurs cylindres concentriques, mais il existe aussi d'autres structures appelées "en bambou" (bambou) (les NTC sont constitués d'une succession de compartiments)

ou "en arêtes de poisson" (herring-bones ; dans ce cas, les NTC peuvent être vus comme un empilement de cônes graphitiques, avec un canal central débouchant). D'autres types de nanoparticules carbonées, telles que les "nanocornes" (nanohorns) [5], ou encore ayant des morphologies hélicoïdales, se retrouvent aussi fréquemment rangées dans la catégorie des "nanotubes de carbone". Si le nombre de parois n'est *a priori* pas un paramètre très important puisqu'il est le plus généralement directement relié au diamètre externe, la manière dont se présente la paroi externe joue, quant à elle, un rôle primordial : en effet, dans le cas d'une structure en bambou, la quantité de défauts de structure est plus importante (les hexagones de carbone, uniques constituants de la paroi d'un NTC idéal, sont ici localement remplacés par exemple par des paires pentagone – heptagone, qui permettent de déformer localement le réseau carboné en lui donnant une courbure positive ou négative). Le cas est encore plus marqué avec l'organisation en arêtes de poisson avec dans ce cas particulier l'exposition directe de nombreux atomes de carbone en configuration sp^3 . Il faut donc bien garder à l'esprit que sous le terme "nanotubes de carbone" se cache en réalité une diversité de microstructures potentiellement très différentes, et dont on peut attendre par conséquent un impact sur le vivant relativement varié.

1.1 Influence des caractéristiques morphologiques et physico-chimiques

Parmi les nombreux paramètres qui influencent la toxicité des NTC [6], leur longueur (sans doute plutôt leur facteur de forme, Longueur/Diamètre), leur surface spécifique et leur chimie / charge de surface jouent un rôle prépondérant (en faisant abstraction ici de leur pureté chimique, notamment liée à la contamination par des résidus de catalyseurs, et dont l'influence n'est pas intrinsèquement liée aux NTC). Leur longueur tout d'abord, influence directement le passage – ou non - de certaines barrières biologiques telles que la barrière pulmonaire, rénale, intestinale, ou encore hémato-encéphalique. Les macrophages tissulaires ou les monocytes circulants jouent ici un rôle majeur puisque une taille des NTC trop grande ($> 10 \mu\text{m}$) perturbe leur capacité à les prendre en charge et notamment à les déplacer. La longueur des NTC va aussi influencer la manière dont ils peuvent se déplacer dans les végétaux, et plus largement dans les sols (les tubes les plus courts étant les plus mobiles).

Leur surface spécifique varie généralement entre quelques dizaines de mètres carrés par gramme, pour les NTC multiparois de gros diamètre, à presque $1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ dans le cas de NTC biparois [7], la valeur théorique limite étant de $1315 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ [8] dans le cas de NTC monoparoi individuels (et fermés aux deux extrémités) ce qui représente un peu plus que la superficie de trois terrains de basket pour un seul gramme. La surface spécifique est le plus souvent mesurée par adsorption gazeuse en utilisant le modèle BET [9]. Cette mesure est réalisée sur des échantillons de poudres sèches, détail qui a son importance lorsque l'on sait que les tests de toxicité et d'écotoxicité sont le plus généralement réalisés dans des conditions très différentes, en milieu humide à partir de dispersions aqueuses : dans ces conditions, ce n'est pas tellement la surface en interaction avec un gaz qui est à prendre en compte, mais plutôt celle en interaction avec l'eau. L'état d'agglomération des NTC (et donc la manière dont ils ont été séchés puisque leur fabrication implique presque toujours au moins une étape en milieu solvant), la formation ou non de faisceaux plus ou moins organisés, sont des paramètres déterminants pour la valeur de la surface spécifique. Une fois dispersés dans un liquide pour l'étude de leur toxicité, la surface de NTC réellement en interaction avec les cellules est certainement assez différente de celle mesurée expérimentalement par la méthode BET car ces nanoparticules sont intrinsèquement très hydrophobes et donc mal "mouillées" par l'eau. Leur chimie / charge de surface enfin joue un rôle essentiel sur la toxicité [10], notamment parce qu'elle influence directement la capacité des NTC à se disperser dans les liquides, et dans l'eau en

particulier. Leur fonctionnalisation peut être effectuée de manière covalente ou non. En effet, la présence de fonctions chimiques polarisables ou ionisables (fonctions acides carboxyliques, amines, *etc.*) favorise la dispersion dans l'eau en modifiant leur charge de surface, alors que leur absence rend les NTC très hydrophobes et donc très difficiles à la fois à disperser et à stabiliser dans ce solvant. Il existe une interférence importante entre la fonctionnalisation de surface et la longueur des NTC. En effet, la fonctionnalisation nécessite toujours de pouvoir disperser correctement les NTC dans le solvant utilisé, ce qui conduit dans le cas général à procéder à une étape d'oxydation (le plus souvent par un mélange d'acides nitrique et sulfurique) combinée à un traitement aux ultrasons. Ce protocole n'est toutefois pas sans influence sur la longueur des NTC qui sont généralement très endommagés et découpés par de tels traitements, et dont la longueur finale est souvent décrite comme étant inférieure à 1 μm . Il est donc très difficile de faire la part des choses lorsque l'on discute de l'influence de la fonctionnalisation sur la toxicité entre les effets réellement liés à la modification de la chimie de surface et ceux liés à leur découpage involontaire mais le plus souvent inévitable. Enfin, les milieux naturels (fluides biologiques, compartiments environnementaux) contiennent toujours des molécules telles que des protéines (albumine, *etc.*) ou des substances organiques provenant de la décomposition de la matière organique naturelle (acides humiques et fulviques) qui jouent elles-mêmes le rôle d'agents dispersants en recouvrant spontanément les NTC et en les fonctionnalisant de manière non-covalente, et donc *a priori* dynamique (potentiellement réversible, compétition entre différentes molécules).

1.2 Aspects analytiques : détection et quantification dans des matrices organiques

Les défis analytiques liés aux nanomatériaux ont déjà été décrits en détails dans le cas général [11]. Cependant, les NTC, et les nanomatériaux carbonés en général, possèdent quelques spécificités sur lesquelles il est nécessaire d'insister dès à présent. La première concerne leur composition chimique qui les rend difficiles à discerner du reste de la matière organique et qui rend inopérante la plupart des méthodes de chimie analytique qui pourrait être envisagée pour les quantifier dans un environnement biologique ou environnemental. La possibilité de les tracer grâce aux contaminants qu'ils peuvent contenir (résidus catalytiques métalliques) a été envisagée et peut être mise en œuvre de manière qualitative (attester de la présence ou non des NTC) ou quantitative si l'absence des éléments traceurs est avérée dans le milieu considéré et qu'ils sont en quantité suffisante pour être détectés. L'analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse a été proposée pour permettre une analyse quantitative et sélective des NTC mais la nécessité de pouvoir bénéficier d'échantillons de référence parfaitement caractérisés rend sa portée très limitée en pratique [12]. Des mesures par micro-ondes ont été effectuées et présentent un potentiel intéressant même si elles demeurent délicates à mettre en œuvre sur le plan expérimental [13, 14]. L'analyse isotopique demeure la meilleure approche, en particulier lorsqu'il s'agit d'isotopie radioactive (^{14}C) puisque cette dernière permet une analyse à la fois qualitative (imagerie) et quantitative [15] mais reste une option coûteuse et contraignante au niveau expérimental. La spectroscopie Raman est un outil de choix pour la détection des NTC dans des matrices organiques, même si elle peut manquer de sensibilité en cas d'interférences avec la matrice ou de faible signal des NTC, en particulier lorsque ces derniers contiennent beaucoup de défauts de structure (NTC multiparois en particulier). Nous mentionnons malgré tout son utilisation fréquente pour mettre en évidence la biodégradation des NTC en milieu cellulaire ou tissulaire [16], la circulation des NTC au niveau cellulaire [17] ou encore le franchissement de barrières biologiques [18], même si cette technique reste

essentiellement qualitative. La microscopie de fluorescence à deux photons [19] est une technique qui a été utilisée avec succès pour la mise en évidence des NTC dans des matrices biologiques, qu'il s'agisse de cellules animales ou de tumeurs [20] ou encore de plantes [21]. Cette technique présente le gros avantage de ne nécessiter aucun marquage spécifique des NTC et permet ainsi de les détecter sans modifier leur interaction avec le vivant. Terminons en rappelant que des données d'apparence aussi simples que la longueur des NTC sont généralement très difficiles voire impossible à mesurer soit parce qu'ils sont très entremêlés (faisceaux de NTC), soit parce que leur facteur de forme (rapport longueur / diamètre) très élevé (> 5000) rend inadaptées les techniques optiques habituelles basées sur la diffusion de la lumière dans lesquelles le calcul du diamètre des particules est généralement réalisé en faisant l'hypothèse qu'elles sont sphériques. De même, la microscopie électronique à transmission (MET [22]), qui est la technique de référence pour confirmer la présence de nanoparticules (en général) et les identifier (en particulier lorsqu'elles ne sont pas carbonées, grâce aux outils spectroscopiques associés tels que l'EDS ou l'EELS) ou atteint ses limites lorsqu'il s'agit de mettre en évidence la présence de NTC à très faible nombre de parois (monoparoi, biparoi) du fait de leur faible contraste électronique lorsqu'ils sont inclus dans du matériel biologique, et de nombreuses confusions possibles avec les parois de différents organites à l'intérieur des cellules – sans parler des artéfacts liés à la préparation des échantillons (échantillonnage sélectif lors de la préparation d'une grille de microscopie, entraînement de NTC lors d'une découpe par microtomie, effet d'orientation des NTC dans le sens de la découpe [23]). En règle générale, l'utilisation d'une seule méthode analytique est insuffisante et il est toujours nécessaire d'en combiner plusieurs apportant chacune des informations complémentaires.

2 Impact des NTC sur la santé

Bien que leur composition chimique soit différente, les NTC sont souvent comparés aux fibres d'amiante en raison de leur faible diamètre, de leur longueur élevée et de leur stabilité chimique dans des environnements physiologiques, se traduisant par une biopersistance importante [24]. Ainsi, la connaissance des conséquences aiguës et chroniques pour l'organisme d'une exposition à ces particules s'avère être nécessaire du fait de leur utilisation intensive au niveau applicatif. Les effets des NTC sur la santé des mammifères, et plus spécifiquement sur celle des humains, sont étudiés depuis les années 2000 [24]. Dans un premier temps, les recherches sur la toxicité de ces nanoparticules ont eu pour but d'identifier les organes et tissus susceptibles d'entrer en contact avec les NTC (Figure 1).

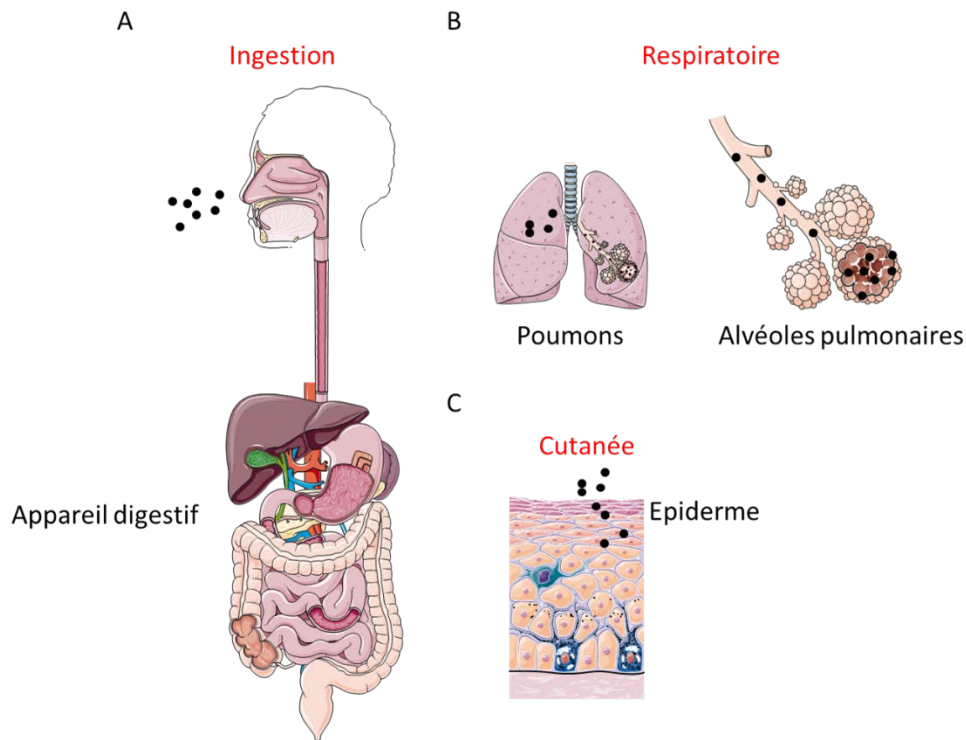


Figure 1 : Les différentes voies d'entrée des NTC dans l'organisme. A, Entrée par ingestion, B, Accès des NTC au compartiment pulmonaire par les voies aériennes et C, pénétration des NTC au niveau de la couche cutanée.

Ainsi, l'exposition digestive, cutanée et pulmonaire ont été mises en évidence comme étant des portes d'entrée au sein de l'organisme pour les NTC [24, 25]. A ce jour, les NTC ne sont pas utilisés dans l'industrie agroalimentaire, contrairement à d'autres nanoparticules comme par exemple le dioxyde de titane TiO_2 , la nano silice SiO_2 ou encore l'oxyde de Zinc, ZnO . Ainsi, l'ingestion des NTC par la voie digestive ne s'avère pas être, sauf accident, une porte d'entrée majeure pour les NTC à la différence des voies aériennes et cutanées. Dans ce contexte, seuls les aspects concernant les voies d'entrée cutanées et respiratoires des NTC seront abordés ci-dessous. Rappelons cependant qu'une partie des particules inhalées finit par être ingérée du fait de leur remontée le long de l'appareil respiratoire grâce à l'action de l'ascenseur muco-ciliaire. Alors que les premières expériences ont étudié l'impact de NTC monoparoi sur la réponse inflammatoire et les dommages tissulaires, la recherche a dévié vers les NTC multiparoi, commercialement plus intéressants (moins chers et plus disponibles) et donc plus fréquents. Ainsi, un nombre important d'études ont pu mettre en évidence, à la fois *in vitro* avec des systèmes de culture cellulaire et *in vivo* chez des rongeurs (souris et rats), que les NTC induisaient une réaction inflammatoire et des dommages tissulaires, fortement dépendants de leurs propriétés physico chimiques (longueur, diamètre, fonctionnalisation, dispersion) [24-26]. Alors que les effets de longueur, fonctionnalisation et dispersion des NTC sur la viabilité cellulaire sont bien connus, ceux relatifs à leur diamètre le sont beaucoup moins même si, quelques études ont mis en évidence que les NTC multiparoi de petit diamètre (entre 15 et 40nm) induisent une toxicité plus importante sur les cellules immunitaires macrophages que des NTC de diamètres plus importants (>40 nm), trouvés peu toxiques [27]. L'influence du diamètre reste cependant à élucider puisque des effets contraires sont aussi décrits dans d'autres études (voir ci-dessous, paragraphe tumorigénèse).

2.1 Interactions avec le système pulmonaire

Inflammation

Après inhalation, bien que la majorité des particules (dont les NTC) soit évacuée par les cellules ciliées bronchiques, la cible principale des NTC est le système pulmonaire composé des alvéoles pulmonaires en contact avec l'extérieur et les poumons, centre de traitement des échanges gazeux notamment. Les alvéoles sont tapissées de cellules épithéliales, productrices de mucus ou encore neuronales. L'ensemble de ces cellules assure le bon échange de gaz (oxygène, dioxyde de carbone) mais également joue un rôle immunitaire de par la production de mucus et l'expression de nombreux récepteurs de signalisation immunitaire [28]. S'ajoutent à ces cellules, des cellules immunitaires professionnelles, jouant le rôle de sentinelles dans les alvéoles, les macrophages alvéolaires. Leurs fonctions de cellules phagocytaires, l'expression d'un arsenal toxique (espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, pH, enzymes, etc.) associées à l'expression de nombreux récepteurs modulant la production de médiateurs inflammatoires (chimiokines, cytokines, lipides bioactifs), en font des cellules clefs de l'immunité mais également les premiers acteurs cellulaires de la réponse aux NTC dans les alvéoles pulmonaires [29, 30]. La réponse inflammatoire est, tant qu'elle reste contrôlée, extrêmement efficace quant à l'élimination des microorganismes grâce, notamment, au recrutement de nouveaux effecteurs cellulaires microbicides. Cependant, en raison de sa toxicité pour l'organisme, cette réaction se doit d'être transitoire afin de permettre une réparation tissulaire efficace. Ainsi, l'exposition chronique aux particules d'amiante ou de silice conduit au développement d'une inflammation chronique à bas bruit, permettant le développement de pathologies pulmonaires (déficits respiratoires) mais également de processus tumoraux, tels que le mésothéliome dans le cas de l'amiante [31-34]. Ceci s'explique essentiellement par la forte biopersistance de ces particules (faible capacité d'élimination par l'organisme), mais également par l'exposition chronique de certains pans de la population à ces particules, entraînant une incapacité chronique de l'organisme à éliminer correctement ces particules. Dans ce contexte, des études portant sur l'exposition de souris et de rats ont mis en évidence que les NTC inhalés conduisaient à la mise en place d'une inflammation pulmonaire, la formation de granulomes (structures cellulaires chargées de contenir les nanotubes) et une réaction fibrotique [35, 36]. Ainsi, l'exposition pulmonaire de souris ou de rats à des doses de NTC monoparois allant de 0.1–0.5 mg induit la formation de granulomes cellulaires associés aux particules agglomérées, ainsi qu'à une inflammation pulmonaire, dépendante de la dose et du temps d'exposition [35, 36]. En parallèle, l'exposition de souris à des nanotubes multiparois déclenche une forte inflammation pulmonaire qui dépend du type de fonctionnalisation de ces NTC. Cependant, l'ajout d'un groupement carboxylique (COOH) sur ces particules réduit l'inflammation, probablement du fait d'une diminution de leur état d'agglomération, ce qui entraîne une diminution des interactions entre les NTC et les cellules, et plus spécifiquement les macrophages [37, 38] (du coup, l'impact de la fonctionnalisation ne prend-il pas le pas sur le facteur de forme ? Par ailleurs, il est dit plus haut que les fonctions carboxyliques favorisaient la dispersion dans les milieux aqueux, et donc les échanges, et donc la réactivité : n'est-ce donc pas contradictoire de dire qu'alors la cause de réduction d'inflammation est "probablement du fait d'une réactivité réduite des NTC avec les cellules" ???). En effet, au cours de leur inhalation, les NTC vont rencontrer de nombreux types cellulaires, incluant les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, qui tapissent les bronches et les alvéoles pulmonaires. Les monocytes/macrophages, de par leurs positions stratégiques au sein des alvéoles pulmonaires seront également amenés à interagir avec les NTC. Ainsi, une autre étude a montré que des NTC multiparois fonctionnalisés avec des fonctions hydroxyles (OH) induisaient chez des souris traitées à des doses de 20 et 40 µg une inflammation aiguë et des dommages pulmonaires réduits par

rapport à des NTC non fonctionnalisés [39]. De manière importante, les auteurs de ces études suggèrent que les NTC fonctionnalisés grâce aux fonctions OH et COOH sont mieux éliminés par les cellules pulmonaires grâce à l'action des peroxydases, exprimées par les cellules immunitaires monocytes, macrophages et neutrophiles [40, 41]. Il est certain que les NTC qui possèdent des fonctions oxygénées sont aussi spontanément moins agglomérés que leurs homologues non fonctionnalisés, et donc plus accessibles aux peroxydases (~~oui, mais agglomérés veut aussi dire moins réactifs car moins dispersés~~).

Tumorigenèse

La structure fibreuse des NTC, associée à leur capacité à induire une réaction inflammatoire, fait des NTC des acteurs potentiels dans le développement de processus tumoraux chez les individus chroniquement exposés à ces nanoparticules. Ainsi, il a été montré que l'instillation de NTC multiparois causait la formation de structures granulomateuses similaires à celles vues dans le cadre de l'amiante, ce qui suggère un lien potentiel entre exposition aux NTC et les processus cancéreux issus d'une exposition chronique à l'amiante [42-44] (Figure 2).

De plus, l'utilisation de modèles de souris très susceptibles à la formation de tumeurs (hétérozygotes pour le régulateur tumoral p53) a mis en évidence que les NTC multiparois augmentaient de manière significative la formation de mésothéliums, cancers pleuraux, lors d'une exposition unique des souris à ces nanoparticules [45]. Cependant, il est important de préciser que les souris utilisées ont un fond génétique les prédisposant au développement spontané de tumeurs. L'utilisation de rats non-prédisposés aux processus tumoraux a montré un effet pathogénique similaire des NTC par rapport à celui observé dans les souris susceptibles aux processus tumoraux [46]. Ainsi, dans cette étude, le diamètre des NTC semble jouer un rôle primordial sur l'induction d'un processus pro-tumoral. Par exemple, les NTC dits "fins et rigides" (diamètre 50 nm) étaient les plus pathogéniques alors que les NTC de diamètre 150 nm ont été trouvés moins pathogéniques. D'autres études n'ont mis en évidence aucune formation de structures mésothéliales après injection dans le péritoine de souris et de rats de NTC multiparois [47, 48]. Ces divergences peuvent probablement être expliquées par les différents types de NTC utilisés mais également par les différences d'espèces animales et les conditions d'exposition utilisées. Ceci suggère que des expériences bien mieux standardisées sont requises afin de déterminer 1) si les NTC présentent des propriétés pro-tumorales mais également 2) les conditions requises pour l'expression de ces propriétés cancéreuses.

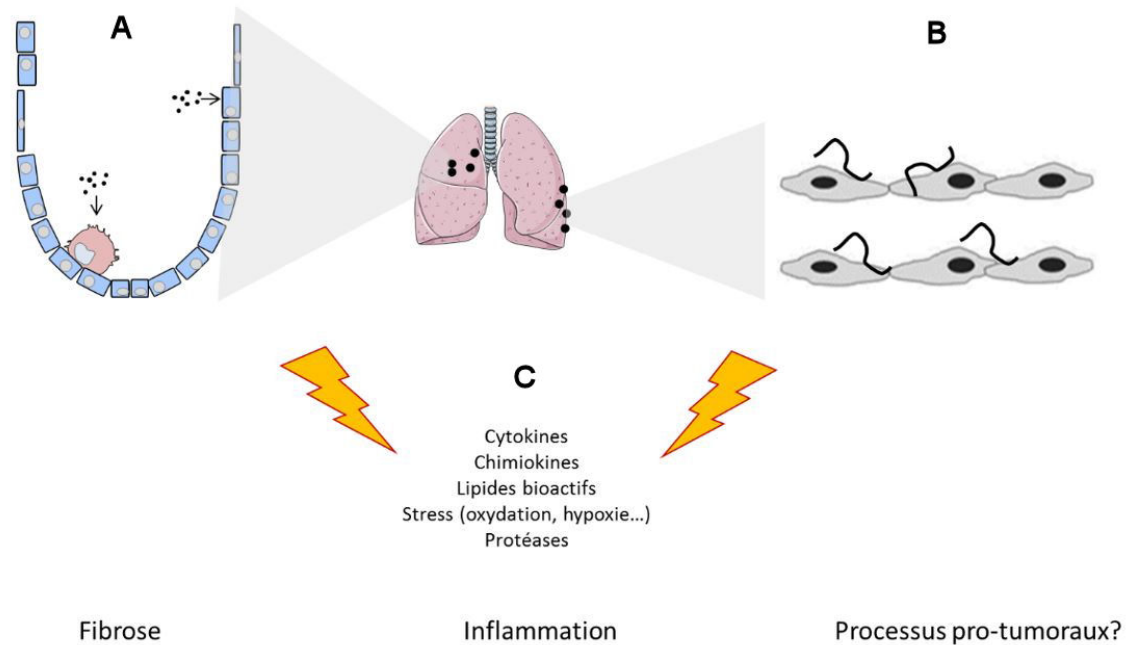


Figure 2. Conséquences sur l'organisme des interactions entre les NTC et leur environnement pulmonaire. A, Les NTC interagissent avec les cellules épithéliales (bleues) et macrophages (roses) des alvéoles pulmonaires. B, Les NTC entrent en contact avec les cellules mésothéliales dans les poumons. C, Les interactions cellulaires avec les NTC conduisent à la mise en place d'une réaction inflammatoire, fibrotique et potentiellement pro-tumorale.

2.2 Interactions avec le compartiment cutané

Bien que le poumon constitue l'une des principales portes d'entrée des NTC dans l'organisme, la peau est également une surface de contact avec ces nanoparticules. Ainsi, l'exposition du derme avec les particules de carbone a déjà été décrite et peut induire une dermatite, à savoir la présence d'une réaction de type allergique. Cependant, les données quant à l'effet des NTC sur la peau demeurent limitées, notamment du fait que la couche superficielle de l'épiderme limite fortement la pénétration des NTC dans les compartiments sous-cutanés [49]. Il a été mis en évidence que des NTC monoparoi et multiparoi implantés en sous-cutané dans des souris induisaient la formation de granulomes cellulaires jusqu'à 3 semaines après exposition aux NTC, une observation retrouvée chez le rat [50, 51]. Une autre étude a démontré que l'exposition cutanée aux NTC monoparoi (40–160 µg/souris pendant 5 jours) induisait une augmentation de l'épaisseur cutanée, un indicateur de la présence d'un œdème et d'une inflammation [52]. Ainsi, ces trois études suggèrent qu'une exposition cutanée aux NTC peut induire une réaction inflammatoire mais également allergique. Cependant, au vu du peu d'études réalisées dans ce contexte, ces résultats méritent d'être répétés afin d'avoir une reproductibilité suffisante avant de conclure définitivement sur le potentiel dangereux des NTC sur la peau.

Au-delà de leur potentiel allergique, les kératinocytes exposés à des NTC multiparoi fonctionnalisés avec des fonctions carboxylates peuvent induire des dommages oxydatifs sur l'ADN de ces cellules [53]. Cependant, les auteurs ont noté que ces dommages n'étaient pas suffisants pour induire une réponse cytotoxique et que la cellule pouvait réparer son ADN. Les effets d'une exposition chronique sur la viabilité cellulaire et le potentiel tumoral des NTC sur les kératinocytes restent donc à démontrer.

2.3 Importance de l'environnement sur les effets toxiques des NTC

Un aspect peu étudié dans les études précédentes de toxicité des nanoparticules sur l'organisme concerne l'environnement dans lequel ces nanoparticules seront amenées à interagir avec l'organisme, avec potentiellement des effets synergistes ou antagonistes à l'effet propre de ces particules. Récemment, des études sur les NTC ont pu mettre en évidence que l'oxydation à l'acide nitrique de ces nanoparticules entraînait l'adsorption d'un composé bactérien présent dans tous les milieux et extrêmement immunogène et inflammatoire, le LipoPolySachharide (LPS) [54]. Ceci a pour effet de modifier considérablement la réponse des cellules de l'organisme et notamment leur capacité à mourir ou sécréter des facteurs inflammatoires [54]. En parallèle, des études ont également montré que les composants pulmonaires (surfactant, mucus, sérum) étaient capables de se lier aux NTC sous certaines conditions (impuretés métalliques, fonctionnalisation des NTC, etc.) [55, 56]. Cela entraîne une meilleure dispersion des NTC, mais également une modification de la réponse inflammatoire, qui se trouve exacerbée. La modification éventuelle de la bio-persistance ou de l'élimination des NTC par les cellules de l'organisme n'a pas été évaluée.

Ainsi, même si très peu d'études ont abordé cette problématique, il est important de garder à l'esprit que les NTC ne seront jamais libres lors de leurs interactions avec l'organisme, et que leurs interactions avec leur environnement, associées à leurs modifications de surface, peuvent fortement moduler leurs effets sur l'organisme.

2.4 Bio-persistance et élimination

Les études sur les rongeurs ont mis en évidence que les NTC induisaient une réaction inflammatoire, une fibrose et pouvaient avoir la capacité de promouvoir une réponse mésothéliale maligne similaire à celle de l'amiante. L'inhalation constitue une des routes principales d'exposition, surtout au sein de l'industrie des nanotechnologies, posant la question de la sécurité des personnes exposées.

Notre organisme possède des moyens d'éliminer les particules, par exemple le système cilié (bronchique, intestinal), l'urine, les fèces, la sueur, les larmes ou encore la toux. Cependant, ces systèmes d'élimination ont un seuil de fonctionnement : si ce dernier est dépassé, leurs fonctions ne peuvent plus être assurées efficacement. En parallèle, les macrophages et autres cellules phagocytaires (par exemple les monocytes et neutrophiles) sont les premières visées par les particules inhalées dans les poumons [57]. Ces cellules vont rapidement ingérer et phagocyter les particules afin de les éliminer elles-mêmes de par la mise en place de processus oxydants (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et radicaux hydroxyles), acides et enzymatiques puissants [57-59]. La biopersistance se définit par la dose à partir de laquelle les particules sont retenues dans les poumons après exposition aux processus dégradatifs de l'hôte. Ainsi, Allen *et al.* [58] ont été les premiers à mettre en évidence que l'exposition de NTC monoparoi à du peroxyde d'hydrogène (40 µM) et à l'enzyme peroxydase, conduisait à leur dégradation après 12 semaines, ce qui traduit une dégradation extrêmement lente. Par la suite, de nombreuses études ont mis en évidence que la dégradation des NTC par les ERO et les peroxydases était liée à la présence de fonctions réactives (OH, COOH) sur la paroi externe des NTC [59, 60]. Ainsi, la fonctionnalisation des NTC permet une amélioration de leur dégradation par les ERO et peroxydases, diminuant le temps d'élimination à 90 jours, un processus également observé chez les souris exposées aux NTC fonctionnalisés.

3 Impact environnemental

Les prédictions montrent une augmentation de la production et de l'utilisation des NTC

dans les années à venir [61]. En parallèle, leur dissémination dans l'environnement devrait donc augmenter en conséquence. Bien que les données disponibles soient fragmentaires, la recherche en nano-écotoxicologie s'efforce d'évaluer au mieux les risques pour l'environnement associés à la présence de NTC dans le milieu naturel pour une meilleure évaluation des risques. Il est également indispensable d'identifier quels sont les paramètres physico-chimiques des NTC permettant éventuellement de réduire leur toxicité afin de pouvoir se diriger vers l'approche de synthèses de NTC "safer by design".

3.1 Compartiment terrestre

L'écosystème terrestre est souvent le premier réceptacle d'une contamination. C'est un milieu très complexe qui se trouve à l'interface avec les autres compartiments que sont l'air et l'eau. Du fait de la complexité des études se focalisant sur les interactions entre particules du sol et NTC, aucun article n'a été publié sur le comportement des NTC dans les sols durant ces trois dernières années. Cependant, des études plus anciennes ont montré que le comportement des NTC dans le sol varie principalement en fonction de leur morphologie (diamètre, longueur), de leur chimie de surface (charge de surface et fonctionnalisation), de leur état d'agglomération dans la solution de sol, mais également en fonction de la taille des particules du sol, de sa porosité, de son hétérogénéité, de sa texture et de sa perméabilité [62-64]. De façon générale, les NTC semblent être retenus dans le sol sauf dans certains cas particuliers : par exemple, les NTC multiparois chargés négativement semblent s'écouler dans la matrice du sol. En effet, une grande partie des composants du sol, tel que le complexe argilo-humique, est également chargée négativement menant à des effets de répulsion qui facilitent le transit des NTC. Ils peuvent également interagir avec d'autres polluants présents dans le sol et en modifier la biodisponibilité et la toxicité pour les autres organismes. Il y a globalement un manque d'informations considérable sur le comportement des NTC dans les sols et leurs interactions avec les autres contaminants. Plus d'études sont nécessaires afin de pouvoir anticiper leur comportement dans ces milieux complexes.

3.1.1 Interactions avec les microorganismes du sol

Dans les sols, les NTC peuvent interférer avec de nombreux organismes vivants. Les effets des NTC sur l'activité microbienne du sol ont été peu documentés. L'influence des NTC mono et multiparois sur l'activité microbienne d'un sol agricole a été étudiée mettant en évidence une augmentation de la minéralisation en stimulant certains décomposeurs du sol alors que les NTC monoparoi ont eu un effet inhibiteur sur la minéralisation en diminuant l'activité microbienne du sol [65]. Or, une diminution de la minéralisation dans le sol implique une diminution du stock de carbone utilisable par les plantes pour leur croissance. Une autre étude à long terme (un an) réalisée en incubant du sol avec trois NTC multiparois différents (longueur, diamètre et surface spécifique différents) a mis en évidence que ces trois types de NTC réduisaient de manière importante la quantité d'ADN extraite du sol et altéraient les communautés bactériennes [66]. Enfin, une autre étude récente portant sur l'influence des NTC multiparois sur la biodisponibilité et la toxicité d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur les communautés microbiennes du sol a montré qu'ils avaient tendance à minimiser la toxicité des HAP sur les communautés microbiennes même si en détails, leur influence semblait dépendre également du type de sol utilisé [67]. De manière générale, les NTC semblent donc perturber le fonctionnement des communautés bactériennes du sol. Des facteurs comme la structure des NTC (par exemple nombre de parois) semblent avoir une influence sur la toxicité. Cependant, les concentrations utilisées dans ces études sont très élevées comparées à la réalité environnementale (0,2 à 2000 mg.kg⁻¹ vs. <10 µg.kg⁻¹ [61]).

3.1.2 Interactions avec les macro-organismes du sol

En ce qui concerne les effets sur les macro-organismes du sol, deux études ont été publiées récemment, l'une portant sur des vers de terre exposés en milieu liquide et l'autre sur des vers exposés en sol, toutes deux étant focalisées sur l'étude de la toxicité des NTC multiparois. En milieu liquide, des analyses au niveau génomique et protéomique ont permis de démontrer une surexpression des gènes relatifs à la phagocytose (ingestion de particules étrangères par des cellules spécialisées), ce qui suggère une entrée des NTC par ce processus [69]. Les mécanismes de toxicité évoqués étaient le stress du réticulum endoplasmique impliquant une accumulation de protéines non fonctionnelles dans cet organite pouvant mener à la mort des cellules ainsi que le stress oxydatif provoquant en particulier un endommagement de l'ADN. Dans un milieu plus pertinent au niveau environnemental(sol), la présence de NTC a entraîné une déstabilisation de la membrane des lysosomes (vésicules impliquées, entre autres, dans la réponse immunitaire), une inhibition de l'acétylcholinestérase (enzyme impliquée dans la transmission de l'influx nerveux) ainsi qu'une augmentation de la concentration en métallothionéines (protéine qui protège les cellules contre les agressions des ions métalliques) suggérant la mise en place de mécanismes de défense chez le ver de terre en réponse à la présence de NTC dans son milieu [70]. A ce jour, aucun autre macro-organisme du sol ne semble avoir été étudié. De la même façon que pour les micro-organismes, une exposition aux NTC semble conduire à des situations de stress chez les macro-organismes du sol, mais une fois encore les conditions d'expositions ne sont pas réalistes.

3.1.3 Interactions avec les végétaux terrestres

Les végétaux sont des organismes clés dans l'étude de la toxicité d'un contaminant puisqu'ils se trouvent à l'interface entre les trois compartiments environnementaux que sont l'eau, l'air et le sol. Un nombre plus important d'études est disponible concernant le transfert et l'impact des NTC sur les plantes par rapport aux autres organismes terrestres. Cela s'explique, en partie, par le fait que les NTC pourraient être intéressants en agriculture en tant que fertilisant.

Quelques études se sont focalisées sur le transfert des NTC dans les plantes selon plusieurs techniques : marquage au carbone 14, microscopie électronique à transmission (MET) ou encore spectroscopie comme la spectroscopie Raman ou la spectroscopie infra-rouge. Il a été montré à plusieurs reprises que les NTC pénétraient dans les plantes par les racines puis étaient transférés vers la partie supérieure de la plante. La figure 3 synthétise le trajet des NTC dans les plantes [70].

Les NTC peuvent entrer dans les racines via la pression osmotique, les forces capillaires, les pores des parois ou par pénétration directe par les poils racinaires ou à travers la paroi cellulaire des racines primaires. Ils peuvent traverser les parois cellulaires et les membranes cellulaires (Figure 3-2) pour rejoindre le système vasculaire et être transportés avec l'eau et les nutriments sous l'influence de la transpiration dans la partie aérienne de la plante (Figure 3-3). Dans les feuilles, ils ont été retrouvés accumulés dans les vaisseaux conducteurs de la sève des feuilles et au niveau des nervures (Figure 3-4). Dans les cellules, les NTC sont principalement détectés dans le cytoplasme, la paroi cellulaire, la membrane cellulaire, les chloroplastes et les mitochondries (Figure 3-5).

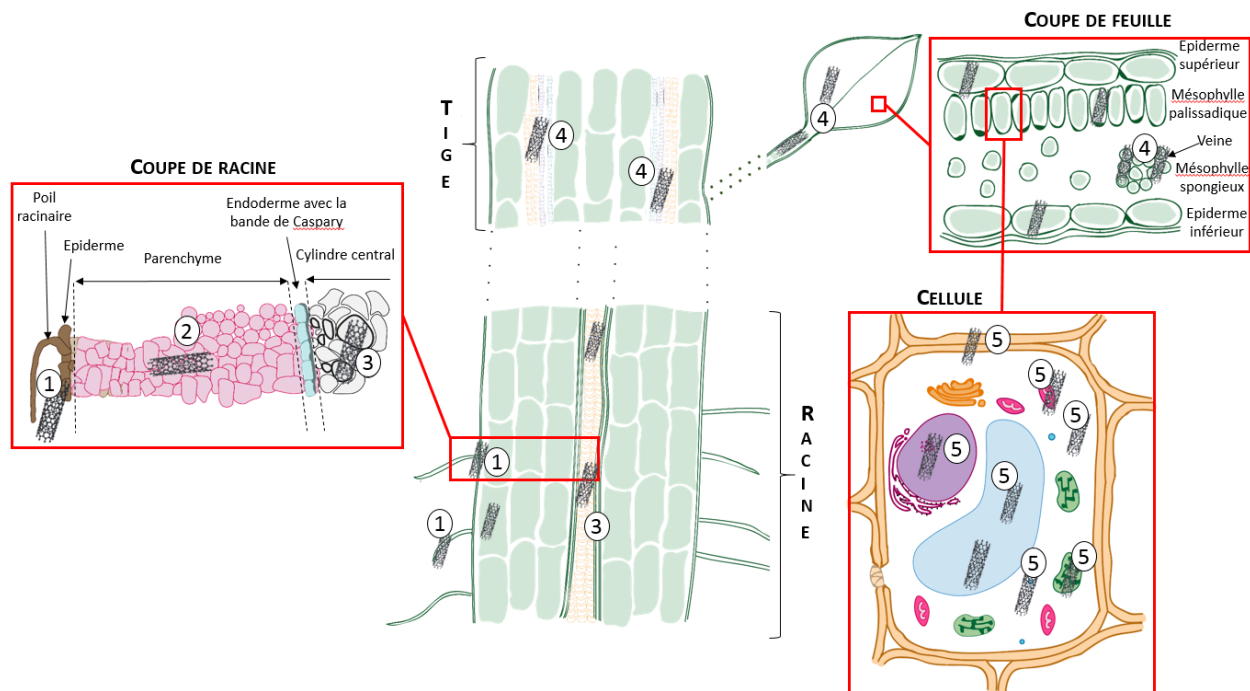


Figure 3 : Transfert et distribution des NTC dans les plantes [70]. Dans la cellule, en bleu clair : la vacuole, en vert : les chloroplastes, en violet : le noyau avec le réticulum endoplasmique rugueux, en orange : le réticulum endoplasmique lisse, en rose : les mitochondries et en bleu foncé : les vésicules de transport.

Certaines études se sont focalisées sur la graine et ont montré que les NTC sont également capables de pénétrer dans les graines de chou (*Brassica oleracea*) [71], de riz (*Oryza sativa*) [72] ou encore de tomate (*Solanum lycopersicum*) [73] en conditions hydroponiques.

A ce jour, les mécanismes d'entrée des NTC dans les cellules sont encore assez obscurs. Beaucoup de recherches sont actuellement en cours afin de développer des techniques efficaces de détection des NTC dans les matrices biologiques pour améliorer notre compréhension du système.

En parallèle, des études de toxicité ont porté sur la jeune plante et la plante adulte mais très peu ont été menées en utilisant des temps d'exposition longs (plus de 30 jours), et encore moins d'études ont été réalisées sur le cycle végétatif complet. Les effets des NTC sur les plantes restent donc mal identifiés. Certains travaux montrent des effets considérés comme étant plutôt "positifs" comme par exemple l'augmentation du taux de germination, de la taille et de la biomasse de jeunes plants de tomate (*Solanum lycopersicum*) après exposition à des NTC multiparois fonctionnalisés avec des fonctions carboxyles (-COOH) [73, 74]. Les auteurs expliquent ce phénomène par la surexpression des gènes relatifs aux aquaporines (canaux régulant l'entrée d'eau dans l'organisme). Ces premiers résultats ont entraîné l'apparition d'études dédiées à l'utilisation des NTC comme « fertilisants » pour l'agriculture.

Cependant, d'autres études rapportent que les NTC présentent plutôt des effets "négatifs" sur les plantes. En effet, les NTC ont entraîné à plusieurs reprises une diminution de la croissance végétale et d'autres signes de toxicité tels qu'une augmentation du stress oxydatif qui provoquent des dommages importants dans les cellules [75, 76].

Enfin, d'autres études révèlent que les NTC n'auraient pas d'impact. En particulier, aucun impact n'a été observé sur des espèces telles que la carotte (*Daucus carota*),

le blé (*Triticum aestivum*) ou le colza (*Brassica napus*) exposées à des NTC multiparois en hydroponie [77, 78].

Dans certaines études, il a été montré que l'impact des NTC variait en fonction des paramètres physico-chimiques des NTC. Du fait du nombre limité d'études et de la difficulté de les comparer entre elles (notamment lié au manque de détails sur le design expérimental), il est difficile de dégager des tendances de l'impact de la fonctionnalisation ou du nombre de paroies des NTC sur leur toxicité. La longueur des tubes est un paramètre qui semble important à prendre en compte dans le transfert des NTC dans les plantes. En effet, il a été montré que les NTC multiparois avec une longueur supérieure à 200 nm s'accumulaient dans les organites des cellules comme les mitochondries tandis que les NTC multiparois avec une longueur comprise entre 30 et 100 nm étaient observés dans les vacuoles, les noyaux et les vésicules [79]. Cependant, cette étude est la seule à rapporter une localisation différente des NTC selon leur longueur. D'autre part, jusqu'à maintenant aucune image de MET publiée ne montre des NTC avec une longueur supérieure à 500 nm dans les cellules végétales. On peut donc se demander si seuls les NTC d'une taille inférieure à 500 nm sont capables de pénétrer dans les cellules et d'être transférés vers les organes supérieurs des plantes, ou si une dégradation des NTC intervient à l'intérieur de la plante, ce qui conduirait à les raccourcir. Les NTC sont réputés peu biodégradables mais il a été prouvé à plusieurs reprises que les peroxydases sont capables de les dégrader [80, 81].

Des conclusions précises sur la toxicité et le comportement des NTC dans l'écosystème terrestre sont donc difficiles à établir à ce jour. Cependant, il est possible de distinguer trois impacts différents sur l'écosystème terrestre : un impact plutôt "positif" avec par exemple une augmentation de la croissance et du taux de germination dans les plantes ; des effets négatifs comme une diminution de la quantité d'ADN microbien du sol ou encore un stress oxydatif chez les plantes et les macro-organismes ; et enfin pas d'effet détectable des NTC. Finalement, il faut insister sur le fait que toutes les études ont été réalisées avec des doses très élevées de NTC, et toujours très supérieures à celles que l'on pourrait penser retrouver dans l'environnement. Comme ailleurs, les difficultés de détection et de quantification des NTC dans les milieux complexes que sont les sols et les matrices biologiques représentent un défi majeur pour ce type d'études.

3.2 Compartiment aquatique

Des effets non désirables peuvent être générés par ces nouveaux matériaux que représentent les NTC sur l'ensemble des compartiments biologiques des écosystèmes aquatiques et des êtres vivants qui les peuplent (Figure 4). Par conséquent, il est fondamental de caractériser les effets potentiels pouvant être générés chez les organismes exposés et comprendre les mécanismes de toxicité mis en jeu. Comme dans l'écosystème terrestre, les données disponibles dans les bases bibliographiques mettent en évidence une pluralité d'effets, mesurés chez des organismes de différents niveaux trophiques comme les bactéries, les algues, les invertébrés et les vertébrés aquatiques. Les travaux présentés dans cette partie font état de résultats récents acquis dans le cadre d'études en nano-écotoxicologie.

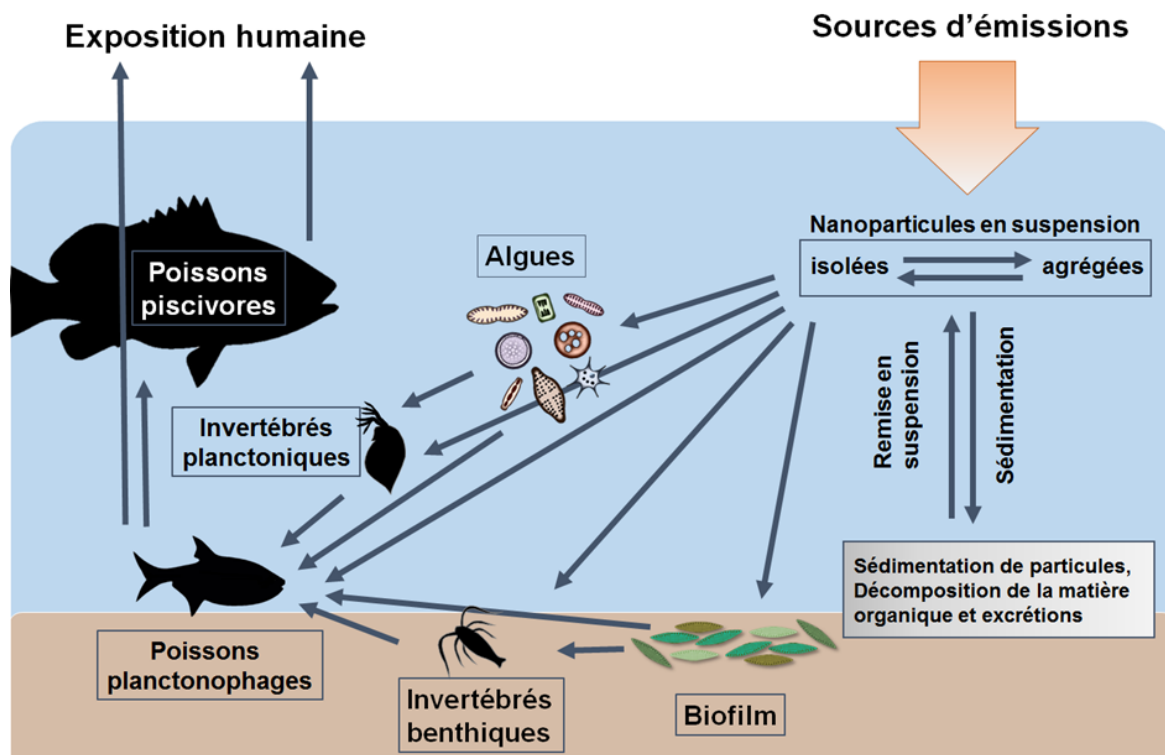


Figure 4 : illustration des interactions potentielles entre les nanoparticules et les différents compartiments biologiques des milieux aquatiques.

3.2.1 Interactions avec les microorganismes (algues et bactéries)

Les bactéries et les algues jouent un rôle clef dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques au sein des biofilms ou libres dans le milieu. En effet, en tant que producteurs primaires, elles sont les contributeurs majoritaires de la production en matière organique, permettant le maintien des populations appartenant aux chaînes trophiques supérieures. La perturbation de ces communautés, suite à leur exposition à un contaminant, peut ainsi impacter de façon indirecte les autres organismes.

De nombreuses études font état des propriétés antibactériennes que possèdent les NTC, faisant l'objet de plusieurs revues bibliographiques [82-84]. Un point notable parmi les travaux publiés réside dans l'influence des caractéristiques physico-chimiques des nanotubes ainsi que leur état d'agglomération dans la modulation des effets toxiques envers les bactéries. Ainsi, les NTC monoparoi exercent une activité antibactérienne plus importante quand ils sont individualisés plutôt qu'agglomérés [85]. Cette cytotoxicité des NTC est générée par des dommages membranaires provoqués suite au contact direct entre les cellules et les nanotubes [86, 87]. Ces auteurs mettent également en avant l'influence du diamètre des nanoparticules dans la modulation des effets étudiés. Ainsi, l'exposition de bactéries *E. coli* à des NTC mono et multiparoi à une concentration de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ induit une mortalité de 87% et 31% respectivement (cependant, il n'est pas évident que la différence d'effet soit liée uniquement au diamètre puisque la proportion de défauts à la surface – plus importante pour les NTC multiparoi – peut aussi jouer un rôle dans un sens ou dans un autre (cf. § 1.1) ; enfin, les concentrations étant généralement exprimées en masse, le nombre de nanotubes monoparoi auquel sont exposées les bactéries par rapport au nombre de NTC multiparoi pour la même concentration massique est certainement beaucoup plus important). Une étude menée chez *Salmonella typhimurium* indique que la longueur des nanotubes influence également la toxicité générée envers cette souche bactérienne: plus les NTC sont longs, plus leur capacité à interagir et à s'agréger avec les bactéries est importante, résultant en une cytotoxicité accrue [88]. D'autres facteurs peuvent moduler la toxicité des NTC en influençant leur capacité d'agrégation avec les

bactéries. C'est par exemple le cas en présence de matière organique dans le milieu ou selon la nature des fonctions chimiques présentes à la surface des nanotubes [89, 90]. En effet, des études ont démontré des augmentations des propriétés antibactériennes des NTC après fonctionnalisation par divers agents comme des radicaux hydroxyles [91], des nanoparticules métalliques [92, 93], des acides aminés [94], des molécules pharmaceutiques [95] et bien d'autres composés.

Contrairement à la littérature traitant des effets antibactériens des NTC, les données bibliographiques concernant les effets générés chez les microalgues sont moins abondantes mais il apparaît que certains mécanismes de toxicité mis en jeu sont communs chez ces deux types de microorganismes, notamment par contacts directs [96]. Des travaux menés chez l'algue verte *Chlorella* sp. ont permis de déterminer une CE₅₀ d'inhibition de croissance de 1,8 mg/L en présence de NTC. Ces effets surviennent en partie par l'ombrage généré par les NTC sans pour autant affecter l'activité photosynthétique des algues [97, 98]. Il apparaît également que les NTC peuvent être internalisés et induire un stress oxydatif ainsi que des modifications structurales des algues [99, 100]. Des effets similaires d'inhibition de croissance ont été observés lors d'études réalisées chez la diatomée benthique *Nitzschia palea* après exposition à des NTC double et multiparois dispersés à l'aide de matière organique naturelle. Les auteurs mettent également en avant l'induction d'une surproduction d'exopolysaccharides permettant de piéger les NTC dans le biofilm [101, 102].

3.2.2 Interactions avec les invertébrés aquatiques

Les invertébrés possèdent plusieurs rôles trophiques dans les écosystèmes aquatiques en agissant sur la décomposition de la matière organique. Ils peuvent également se positionner en tant que consommateurs primaires ou secondaires. Une perturbation des populations d'invertébrés suite à une contamination peut ainsi modifier les flux de matière organique dans l'environnement. La daphnie, *Daphnia magna*, constitue une espèce d'invertébré modèle très largement utilisée en écotoxicologie et fait l'objet d'une utilisation dans plusieurs tests normalisés au niveau international. Les résultats présentés dans la littérature chez cette espèce indiquent que la daphnie accumule de façon importante les NTC au niveau intestinal, mais leur transfert vers d'autres organes n'a pas été mis en évidence [103]. De plus, il apparaît que l'élimination des NTC du tractus digestif est incomplète même après une période de dépuración [104]. Après 48 heures d'exposition à des NTC monoparois, leur survie et leur comportement de nage ne sont pas affectés, y compris à de fortes concentrations. Les auteurs estiment ainsi une valeur de CE₅₀ à 48 heures supérieure à 100 mg.L⁻¹ [98]. Il a cependant été observé des effets plus contrastés sur les paramètres de survie, nage, croissance et reproduction lors d'expositions à des NTC multiparois en présence de matière organique naturelle, suggérant une inhibition de l'alimentation entraînant un déficit d'apports nutritifs [105-107].

Outre l'utilisation des daphnies, les organismes de l'embranchement des mollusques et des annélides constituent généralement un choix pertinent pour les études écotoxicologiques du fait de leurs traits biologiques (mode de vie, d'alimentation) et de leur rôle dans la structuration des écosystèmes. Parmi les mollusques, il a été observé chez la lymnée l'induction d'un stress oxydatif et des effets génotoxiques après 24 et 96 heures d'exposition à des nanotubes monoparois à des concentrations comprises entre 0,05 et 0,46 mg.L⁻¹ [108]. Chez la sangsue, *Hirudo medicinalis*, l'exposition des organismes à une forte concentration en NTC multiparois (400 mg.L⁻¹) entraîne à court terme (1-12 heures) et long terme (1-5 semaine(s)) l'induction d'une réponse inflammatoire importante, accompagnée d'effets pro-apoptotiques [109, 110]. Bien que des effets toxiques aient été démontrés chez plusieurs espèces d'invertébrés, une étude basée sur le transfert *in situ* de sédiments contaminés par des NTC multiparois démontre qu'après 3 mois, la recolonisation par les invertébrés est plus importante

dans le sédiment contaminé par des NTC par rapport au sédiment non contaminé. A plus long terme (15 mois) et quelle que soit la condition expérimentale considérée, les auteurs observent un rétablissement complet des populations d'invertébrés présentes initialement dans les sédiments [111].

3.2.3 Interactions avec les vertébrés aquatiques

Chez les vertébrés aquatiques, l'exposition et/ou l'incorporation des NTC a été étudiée à différents stades de développement des organismes. Des travaux ont été menés pour déterminer les effets générés sur le développement d'embryons de poissons zèbres exposés aux nanotubes mono et double parois. Les résultats indiquent un retard significatif de développement à de fortes concentrations ($> 100 \text{ mg.L}^{-1}$) [112]. Il a également été mis en évidence chez les embryons de cette même espèce ainsi que chez l'amphibien *Xenopus laevis* une capacité d'éliminer naturellement les NTC suite à leur injection à des stades très précoces de développement [113-115].

Chez les larves ou les organismes aquatiques adultes exposés aux NTC, les voies d'entrée majeures des contaminants sont localisées au niveau du tractus digestif et du système respiratoire. Chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), l'exposition à des NTC conduit à des altérations structurales des branchies [116]. Les auteurs suggèrent que ces altérations peuvent constituer des voies d'entrée vers d'autres organes. Des accumulations importantes de NTC au niveau branchial et intestinal ont clairement été observées chez les larves de l'amphibien *X. laevis* (Figure 5) sans pour autant que soit mis en évidence un transfert vers d'autres organes [117]. Cependant, certains verrous techniques ou technologiques ne permettent actuellement toujours pas de détecter de façon précise la présence des NTC dans des matrices biologiques complexes [118]. L'utilisation de NTC multiparois marqués au ^{14}C radioactif a permis de constater chez le poisson zèbre leur transfert depuis le tractus digestif vers le sang ou les muscles [119]. Malgré une détection avérée des NTC au-delà du tractus digestif, les données de la littérature indiquent dans l'ensemble une faible toxicité chez les vertébrés et dans le cas où des effets toxiques sont observés, ils ne s'expriment généralement qu'à fortes concentrations, considérées comme non réalistes car non représentatives d'un point de vue environnemental [51]. Lors d'études menées chez le poisson médaka (*Oryzias latipes*) et le guppy (*Poecilia reticulata*), aucune mortalité n'a été observée après exposition à des concentrations allant jusqu'à 100 mg.L^{-1} de NTC monoparois et 300 mg.L^{-1} de NTC multiparois respectivement [98, 120]. Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, les résultats indiquent que les NTC sont responsables à court terme de l'induction de dommages à l'ADN réparables (dommages primaires) mais n'induisent pas d'effets génotoxiques irréversibles sur le long terme (absence d'induction de cellules micronuclées ou micronoyaux) jusqu'à des concentrations de 50 mg.L^{-1} [117, 121, 122].

Les nanoparticules carbonées possèdent des caractéristiques intrinsèques uniques qui leur confèrent un comportement différent de celui des produits chimiques classiques et notamment les hydrosolubles. Ainsi, l'utilisation de l'unité de concentration massique classiquement utilisée en écotoxicologie ne peut pas permettre de prédire de façon réaliste la toxicité de ces nanoparticules. Des études récentes ont mis en évidence que la charge de surface de nanotubes multiparois constitue le meilleur prédicteur de mortalité à 24h chez les embryons de poissons zèbres [123] alors que dans le cas de mesure d'inhibition de croissance chez l'amphibien *Xenopus laevis*, la surface constitue le meilleur descripteur de toxicité [124]. Dans ces derniers travaux, les auteurs ont créé un modèle mathématique permettant de prédire l'inhibition de croissance induite chez la larve de Xénope en fonction de la surface de n'importe quel type de nanoparticule carbonée, qu'elle soit brute de synthèse ou fonctionnalisée [125]. Il apparaît que la toxicité des NTC et les mécanismes mis en jeu peuvent être influencés par de multiples paramètres (surface,

chimie de surface, charge, enrobages, solubilité, forme...) pouvant présenter une forte hétérogénéité même au sein d'un même type de nanoparticule [126]. Tout comme dans le cas de la toxicologie humaine, ceci souligne le besoin de disposer de données de caractérisation fines des échantillons utilisés lors des études de toxicologie environnementale.

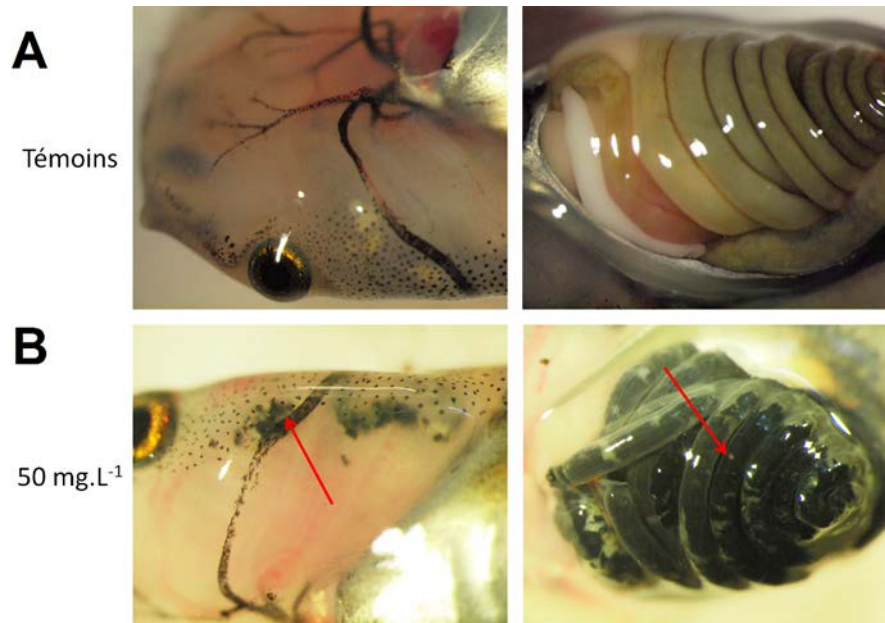


Figure 5 : Photographies de larves de l'amphibien *Xenopus laevis* exposées pendant 12 jours à 0 mg.L⁻¹ (condition témoin) (A) ou 50 mg.L⁻¹ de NTC double parois. (B). Les flèches indiquent la présence de NTC au niveau des branchies et de l'intestin.

3.3 Vers l'utilisation des micro/mésocosmes

Les données présentées précédemment permettent de mettre en évidence les interactions entre les NTC et de multiples organismes aquatiques ainsi que les réponses engendrées à différents niveaux d'intégration biologique. Bien qu'indispensables pour comprendre les mécanismes de toxicité pouvant être mis en jeu, les conditions expérimentales généralement imposées par des protocoles normalisés impliquant la mesure de réponses biologiques chez des organismes isolés et exposés à de fortes concentrations en contaminants sur une courte durée sont loin de constituer des conditions d'études réalistes d'un point de vue environnemental. L'utilisation de micro/mésocosmes permet la mise en place de chaînes trophiques expérimentales afin d'étudier l'éventuel transfert et la répartition de ces nanoparticules entre les différents compartiments trophiques ainsi que le fonctionnement biologique du système à une plus large échelle [127]. A ce jour, peu de travaux publiés font état de l'utilisation de ce type de système expérimental pour étudier le comportement des NTC dans un système aquatique et encore moins en système terrestre. Ceci est probablement lié à la lourdeur expérimentale et analytique inhérente à la mise en place de ces expérimentations. Une équipe a réalisé un suivi de la répartition de NTC monoparoi sur une période de plusieurs mois dans un système aquatique artificiel. Les résultats obtenus indiquent une accumulation importante et une persistance des NTC à la surface du sédiment mais ne permettent pas de mettre en évidence de transfert vers les chainons trophiques supérieurs ou les végétaux [128]. Les données concernant les réponses biologiques des organismes peuplant un écosystème subissant une pression de contamination par les NTC sont actuellement toujours manquantes.

4 Conclusion

Qu'il s'agisse de l'environnement ou de la santé humaine, les questions posées par les interactions entre les NTC et le vivant sont très similaires. Parmi elles, la possible biodistribution dans les organismes ou encore leur éventuelle biodégradation sont centrales pour les effets à long terme. Nous avons vu qu'il n'est pas toujours aussi simple d'établir une relation entre un paramètre physico-chimique et son impact sur le vivant. Si la longueur par exemple joue un rôle majeur sur la capacité des cellules immunitaires à les phagocyter ou à les déplacer, elle est difficile à découpler de l'effet de la chimie de surface puisque les méthodes qui sont utilisées pour découper / raccourcir les NTC conduisent inmanquablement à simultanément modifier leur chimie de surface. Un défi majeur concerne la quantification des NTC dans les tissus ou dans les matrices environnementales après exposition. Il peut être levé par l'utilisation de la radioactivité mais le coût de ces expériences et les difficultés de mise en œuvre en limitent la portée pratique et rendent leur généralisation impossible. La combinaison de plusieurs techniques analytiques demeure la règle pour essayer d'approcher au plus près la réalité des conditions d'exposition. La caractérisation "dans les milieux" telle qu'elle est de plus en plus recommandée pour la publication des résultats des études de toxicité des NTC, serait effectivement idéale mais est généralement inaccessible car elle nécessite la mise en œuvre d'outils peu disponibles et dans des conditions simplifiées assez éloignées de la réalité expérimentale. Ces difficultés de caractérisation, ainsi que l'absence générale d'effets "rapides" aux faibles doses auxquelles sont susceptibles d'être exposés à la fois l'homme et l'environnement, conduisent dans la grande majorité des cas à réaliser des études mettant en œuvre des concentrations en NTC très exagérées. Il est malheureusement très probable que les mécanismes biologiques qui interviennent dans ces conditions soient relativement différents de ceux qui interviennent dans des conditions plus réalistes dans lesquelles les organismes ne sont probablement pas en situation de surcharge. Malgré tout, la tendance est d'aller vers la complexification des modèles expérimentaux, notamment avec l'utilisation de microcosmes ou de mésocosmes au niveau environnemental. Ces derniers permettent de se rapprocher un peu plus de la réalité en combinant plusieurs maillons d'une chaîne alimentaire simplifiée et plusieurs compartiments environnementaux. Il en est de même au niveau santé avec la mise en œuvre de modèles en co-cultures cellulaires ou encore en interface air-liquide afin de mimer au plus près les barrières biologiques que les NTC doivent franchir pour atteindre certains organes ou encore pour rejoindre la circulation sanguine. Force est tout de même de constater que si notre compréhension des mécanismes s'améliore avec le temps, certaines questions essentielles telles que la démonstration *in vivo* du passage de barrières comme les barrières intestinales ou encéphaliques notamment demeurent largement en suspens.

Quoiqu'il en soit, l'amélioration sans cesse croissante des connaissances dans le domaine de l'évaluation des effets toxiques des NTC ne permet malheureusement toujours pas de se faire une idée simple et définitive sur la toxicité réelle de ces nouveaux contaminants. Au niveau environnemental, la méconnaissance des flux actuels ou prévisibles de ces nanoparticules au sein des compartiments de la biosphère constitue un frein réel pour une évaluation efficace des risques liés à l'exposition à ces contaminants potentiels. Par ailleurs, l'accumulation des études en toxicité humaine et environnementale rend compte de la grande dispersion des résultats probablement liée à la multiplicité des différentes formes de NTC étudiés, mais aussi de leur évolution tout au long de la vie des objets manufacturés dans lesquels ils ont été intégrés. Ajoutons à cela la possibilité pour les NTC d'interagir à tous les niveaux d'organisation des systèmes vivants (de la molécule en passant par la cellule, l'individu, les populations voire l'écosystème tout entier) mais aussi

d'interagir avec l'ensemble des constituants des milieux, contaminants compris ; il en résulte une quasi infinité de possibilités d'interactions pouvant avoir des conséquences variées aux différents niveaux du vivant, l'homme y compris.

Une manière simple de limiter les risques potentiels (et on le comprend, quasiment incontrôlables, du moins en l'état actuel de nos connaissances) des NTC serait d'aller vers une conception "safer-by-design" de ces nanoparticules, permettant, en confrontant les travaux des chimistes et des biologistes, de synthétiser des nanoparticules aux propriétés physico-chimiques tout aussi attractives pour les applications industrielles, mais présentant des risques restreints, validés par l'expérimentation biologique.

Glossaire

Acétylcholinesterase

Activité enzymatique (hydrolase) qui assure le clivage de l'acétylcholine au sein des synapses nerveuses des neurones cholinergiques, après passage de l'influx nerveux.

Acides humiques et fulviques ;

Constituants de la matière organique, issus de la décomposition de la biomasse

Alvéoles

Une alveole pulmonaire est un sac creux qui prolonge les voies respiratoires. De nombreux types cellulaires y sont présents, incluant les macrophages alvéolaires et les pneumocytes (cellules épithéliales, essentielles aux échanges gazeux).

Analyse génomique ;

Analyse des modifications de l'ADN d'un organisme

Analyse protéomique ;

Analyse de l'ensemble des protéines d'un organisme

Annélides

Embranchement du règne animal regroupant des vers annelés

Ascenseur muco-ciliaire

Ensemble de cellules produisant du mucus et de cellules ciliées tapissant les voies respiratoires des fosses nasales jusqu'aux petites bronches. Leur action conjointe fait remonter le mucus de bas en haut jusqu'au pharynx, où il est éliminé par voie digestive.

Benthique

Lié au benthos, c'est-à-dire au fond des milieux aquatiques (sable, sédiment, vase,...)

Biopersistance

Accumulation de matière organique, de fibres ou de matériaux biologiques qui ne peuvent être éliminées par les cellules macrophagiques ou le corps.

Carboxylique

Composé chimique contenant le groupement carboxyle de formule -COOH

Chimiokines

Famille de petites protéines solubles qui sont reconnues par les autres cellules et dont le gradient les attire sur le site inflammatoire.

Chloroplaste ;

Organite des cellules eucaryotes végétales contenant la chlorophylle, spécialisé dans le processus de photosynthèse

Hydroponie ;

Culture en milieu liquide (solution nutritive)

Consommateurs primaires/secondaires

Organismes hétérotrophes se nourrissant de végétaux chlorophylliens (consommateurs primaires) ou d'autres consommateurs par prédation (consommateurs secondaires).

Cytokines

Famille de protéines immunologiques qui activent les cellules.

Dermatite

Il s'agit d'une inflammation cutanée.

Diatomées

Taxon (regroupement d'organismes possédant certains caractères communs) de micro-algues

Domages primaires à l'ADN

Premiers niveaux de dommages physiques sur la molécule d'ADN.

Ecosystème

Ensemble des équilibres contribuant au maintien des systèmes vivants.

Exopolysaccharides ;

Polymères naturels de haut poids moléculaire composés de résidus de sucres, synthétisés par la plupart des microorganismes.

Fibrose

Il s'agit d'une augmentation non contrôlée de tissu conjonctif fibreux au sein d'un organe.

Génotoxicité

Toxicité qui se manifeste vis-à-vis des systèmes héréditaires des organismes.

Granulome

Agglomération de cellules immunitaires et non immunitaires autour d'un objet (particule, pathogène) extrêmement difficile à dégrader.

Hétérozygote

Un organisme dont un des deux allèles codant pour un gène est invalidé ou non fonctionnel.

Hydroxyle

Groupe chimique de formule -OH

Macrophages

Cellule immunitaire essentielle à l'ingestion, l'élimination des particules mais également à la régulation de la réponse immunitaire.

Mésothélium

Membrane cellulaire qui tapisse et recouvre l'ensemble des tissus de l'organisme.

Métallothionéines

Protéines soufrées inductibles présentes chez tous les animaux et végétaux et présentant une très forte affinité pour les métaux

Micro/mésocosmes

Reconstitution artificielle à petite échelle (micro) ou à plus grande échelle (mésos) de milieux naturels (cosmes).

Micronoyaux

Petits (micro) noyaux constituant la preuve d'un dommage physique dans la chromatine nucléaire au sein du noyau cellulaire.

Mitochondrie ;

Organite des cellules eucaryotes (végétales et animales), permet la production d'ATP (adénosine triphosphate), molécule fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire

Monocytes

Population de cellules immunitaires dont la différenciation peut donner différents sous types de cellules immunitaires telles que les macrophages ou les cellules dendritiques.

Neutrophiles

Population de cellules immunitaires extrêmement microbicides, recrutées très vite sur le site inflammatoire.

Peroxydase

Enzyme oxydase qui permet de detoxifier les espèces peroxydes de la cellule.

Phagocytose

Processus d'ingestion d'éléments par les cellules immunitaires (macrophages, monocytes, cellules dendritiques et neutrophiles).

Pression osmotique ;

Force qui apparaît entre deux compartiments de charge ionique différente faisant ainsi passer les molécules de la solution la plus concentrée vers la solution la moins concentrée.

Pro-apoptotique ;

Qui favorise l'apoptose, c'est-à-dire la mort cellulaire programmée.

Radical

Espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés et donc hautement réactive, possédant de ce fait une durée de vie très faible.

Régulateur tumoral p53

Facteur de transcription qui régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération. Extrêmement important dans le contrôle tumoral. Son inactivation confère une forte susceptibilité à l'apparition de cancers chez l'Homme et autres mammifères.

Réticulum endoplasmique ;

Organite des cellules eucaryotes (végétales et animales), responsable de la synthèse des protéines.

Safe(r) by design

Approche selon laquelle il est possible de rendre "sûr" (ou plutôt d'améliorer la sûreté) d'un produit en jouant sur la manière de le concevoir. Par exemple, dans le cas des NTC, leur inclusion dans une matrice à laquelle ils confèrent leurs propriétés sans pouvoir la quitter, relève de cette approche.

Stress oxydatif ;

Type d'agression des constituants de la cellule dû à un excès d'espèces réactives de l'oxygène que l'organisme ne peut plus réguler.

Superoxyde

L'ion superoxyde, noté O_2^- est une espèce radicalaire de l'oxygène (ERO). C'est un produit métabolique de toutes les cellules respirant le dioxygène.

Surface spécifique

Surface rapportée à une unité de masse, exprimée le plus généralement en m^2 par gramme.

Trophique

Synonyme d'alimentaire.

Vacuoles ;

Compartiment des cellules végétales principalement, délimité par une membrane, rempli d'eau et contenant diverses molécules inorganiques et organiques telles que des enzymes

Sigles, notations et symboles

BET

Par extension, méthode de mesure de la surface spécifique (surface normalisée par rapport à la masse, exprimée en $m^2.g^{-1}$) basée sur la théorie de l'adsorption de l'azote en monocouche (isotherme de Langmuir), selon la théorie développée par Brunauer, Emmett et Teller.

CE₅₀ ;

Concentration efficace d'un toxique engendrant un effet de 50% par rapport aux contrôles.

EDS/EDX

Energy Dispersive Spectroscopy (spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie) ou *Energy Dispersive X-Ray analysis* : méthode analytique basée sur l'émission des rayons X émis lors de l'interaction d'un échantillon avec un faisceau d'électrons. L'énergie des rayons X émis dépendant du numéro atomique, il est ainsi possible de déterminer la nature des éléments chimiques présents dans l'échantillon analysé.

EELS

Electron Energy Loss Spectroscopy (spectroscopie de perte d'énergie des électrons) : Lorsqu'un échantillon est soumis à un faisceau d'électrons dont l'énergie cinétique

est située dans une plage relativement étroite, l'interaction avec un échantillon conduit à des pertes d'énergies qui dépendent à la fois du numéro atomique des éléments chimiques concernés et de leur environnement chimique (liaisons chimiques). Il est ainsi par exemple possible de faire la différence entre un atome de carbone lié à une fonction carboxyle ou hydroxyle.

ERO

Espèces réactives de l'oxygène produites par de nombreuses enzymes cellulaires. Toxiques contre les pathogènes microbiens.

HAP

Hydrocarbure aromatique polycyclique, classe de contaminants d'origine anthropique composés de cycles benzéniques et connus pour leur toxicité humaine et environnementale.

NTC

Nanotubes de carbone : il s'agit d'une forme allotropique du carbone de la famille des fullerènes. Les NTC contiennent un ou plusieurs feuillets d'atomes de carbone (graphène) enroulés sur eux-mêmes formant un tube, qui peut être fermé à ses extrémités par une molécule de type fullerène. On parle de nanotube monoparoï ou multiparoï selon que le NTC contient un ou plusieurs tubes concentriques.

Toxicité humaine et environnementale des nanotubes de carbone

par **Emmanuel FLAHAUT**

Docteur, Directeur de Recherche CNRS

CIRIMAT, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5085, Toulouse, France

et **Lauris EVARISTE**

Docteur

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

et **Laury GAUTHIER**

Docteur, Maître de Conférences Université Paul Sabatier Toulouse

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

et **Camille LARUE**

Docteur, Chargée de recherche CNRS

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

et **Clarisse LINE**

Doctorante

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

et **Etienne MEUNIER**

Docteur, Chargé de recherche CNRS

IPBS, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS N°5089, Toulouse, France

et **Florence MOUCHET**

Docteur, Ingénieure de recherche CNRS

ECOLAB, Université de Toulouse, UMR CNRS-UPS-INPT N°5245, Toulouse, France

Bibliographie

- [1] The project on Emerging Nanotechnologies, <http://www.nanotechproject.org/>
- [2] Base R-Nano, Déclaration des substances à l'état nanoparticulaire, <https://www.r-nano.fr/>
- [3] SCHLAGENHAUF (L.), KIANFAR (B.), BUERKI-THURNHERR (T.), KUO (Y.Y.), WICHSER (A.), NUESCH (F.), WICP (P.), WANG (J.). - Weathering of a carbon nanotube/epoxy nanocomposite under UV light and in water bath: Impact on abraded particles. *Nanoscale*, 7, p. 18524-18536 (2015).
- [4] CALOGINE (D.), MARLAIR (G.), BERTRAND (J.-P.), DUPLANTIER (S.), LOPEZ-UESTA (J.-M.), SONNIER (R.), LONGUET (C.), MINISINI (B.), CHIVAS-JOLY (C.), GUILAUMME (E.), PARISSÉ (D.). - Gaseous effluents from the combustion of nanocomposites in controlled-ventilation conditions. *J. Phys., Conference Series*, 304, 012019 (2011)
- [5] IJIMA (S.), YUDASAKA (M.), YAMADA (R.), BANDOW (S.), SUENAGA (K.), KOKAI (F.) et TAKAHASHI (K.). - Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nanohorns. *Chem. Phys. Lett.*, 309 (3-4), p. 165-170 (1999)
- [6] HERVE-BAZIN (B.). - Toxicité pulmonaire des particules ultrafines. [NM 8100], *Nanosciences et nanotechnologies* (2006).
- [7] FLAHAUT (E.), BACSA (R.), PEIGNEY (A.) et LAURENT (Ch.). - Gram-Scale CCVD Synthesis of Double-Walled Carbon Nanotubes. *Chem. Commun.*, 12, p. 1442-1443 (2003)
- [8] PEIGNEY (A.), LAURENT (Ch.), FLAHAUT (E.), BACSA (R.) et ROUSSET (A.). - Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon*, 39, p. 507-514 (2000)
- [9] SUN (L.-M.) et MEUNIER (F.). - Adsorption, Aspects théoriques. [J2730], (????)

- [10] MENARD-MOYON (C.) et BIANCO (A.). – Atténuation de la toxicité des nanotubes de carbone grâce à la fonctionnalisation chimique. [IN167], Sécurité et gestion des risques (2014).
- [11] LE HECHO (I.), POTIN-GAUTIER (M.) et LESPES (G.). – Défis analytiques liés aux nanomatériaux. [NM8015], Innovations technologiques (2010).
- [12] PLATA (D.L.), REDDY (C.M.) et GSCHWEND (P.M.). – Thermogravimetry – mass spectrometry for Carbon Nanotube Detection in Complex Mixtures. *Environ Sci Technol.*, 46, p. 12254–61 (2012).
- [13] IRIN (F.), SHRESTHA (B.), CANAS (J.E.), SAED (M.A.) et GREEN (M.J.). - Detection of carbon nanotubes in biological samples through microwave induced heating. *Carbon*, 50, p. 4441–4449 (2012).
- [14] BOURDIOL (F.), DUBUC (D.), GRENIER (K.), MOUCHET (F.), GAUTHIER (L.) et FLAHAUT (E.). - Quantitative detection of carbon nanotubes in biological samples by an original method based on microwave permittivity measurements. *Carbon*, 81, p. 535-545 (2015).
- [15] CZARNY (B.), GEORGIN (D.), BERTHON (F.), PLASTOW (G.), PINAULT (M.), PATRIARCHE (G.), THULEAU (A.), MAYNE L'HERMITE (M.), TARAN (F.) et DIVE (V.). - Carbon Nanotube Translocation to Distant Organs after Pulmonary Exposure: Insights from in Situ ¹⁴C-Radiolabeling and Tissue Radio-imaging. *ACS Nano*, 8(6), p. 5715-5724 (2014).
- [16] ELGRABLI (D.), DACHRAOUI (W.), DE MARMIER (H.), MENARD-MOYON (C.), BEGIN (D.), BEGIN-COLIN (S.), BIANCO (A.), ALLOYEAU (D.) et GAZEAU (F.). - Intracellular degradation of functionalized carbon nanotube/iron oxide hybrids is modulated by iron via Nrf2 pathway. *Scientific Reports*, 7, p. 40997 (2017).
- [17] NEVES (V.), GERONDOPOULOS (A.), HEISTER (E.), TILMACIU (C.), FLAHAUT (E.), SOULA (B.), SILVA (S.R.P.), MC FADDEN (J.) et COLEY (H.M.). - Cellular localization, accumulation and trafficking of double-walled carbon nanotubes in human prostate cancer cells. *Nano Research*, 5, (4), p. 223-234 (2012).
- [18] MOUCHET (F.), LANDOIS (P.), PUECH (P.), PINELLI (E.), FLAHAUT (E.) et GAUTHIER (L.). - CNT ecotoxicity in amphibians: assessment of multi-walled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine*, 5, (6), p. 963-974 (2010).
- [19] REFERENCE TI : BIO7200, ESPINOSA (L.), TOURNEUR (Y.). "Microscopie de fluorescence biomédicale"
- [20] RUBIO (N.), HIRVONEN (L.M.), CHONG (E.Z.), WANG (J.T.W.), BOURGOGNON (M.), KAFA (H.), HASSAN (H.A.F.), AL-JAMAL (W.T.), MCCARTHY (D.), HOGSTRAND (C.), FESTY (F.), AL-JAMAL (K.T.). - Multiphoton luminescence imaging of chemically functionalized multi-walled carbon nanotubes in cells and solid tumors. *Chem. Commun.*, 51, p. 9366-9369 (2015).
- [21] WILD (E.), JONES (K.C.). Novel Method for the Direct Visualization of in Vivo Nanomaterials and Chemical Interactions in Plants. *Environ. Sci. Technol.*, 43, p. 5290–5294 (2009).
- [22] REFERENCE TI : P875
- [23] BOURDIOL (F.), MOUCHET (F.), PERRAULT (A.), FOUQUAUX (I.), DATAS (L.), GANCETR (C.), BOUTONNET (J.-C.), PINELLI (E.), GAUTHIER (L.), FLAHAUT (E.). - Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon*, 54, p. 175-191 (2013).
- [24] DONALDSON (K.), POLAND (C.A.), MURPHY (F.A.), et al. - Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - Similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65 p. 2078–2086 (2013).
- [25] LUANPITPONG (S), WANG L, ROJANASAKUL (Y). - The effects of carbon nanotubes on lung and dermal cellular behaviors. *Nanomedicine*, 9, p. 895–912 (2014).

- [26] FATKHUTDINOVA (L.M.), KHALIULLIN (T.O.), SHVEDOVA (A.A.). - Carbon Nanotubes Exposure Risk Assessment: From Toxicology to Epidemiologic Studies (Overview of the Current Problem). *Nanotechnologies Russ.*, 10, p. 501–509 (2015).
- [27] ALLEGRI (M.), PERIVOLIOTIS (D.K.), BIANCHI (M.G.), CHIU (M.), PAGLIARO (A.), KOKLIOTI (M.A.), TROMPETA (A.F.A.), BERGAMASCHI (E.B.), BUSSOLATI (O.), CHARITIDIS (C.A.). - Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicol. Rep.*, 3, p. 230-243 (2016).
- [28] The lungs at the frontlines of immunity. *Nat. Immunol.*, 16(1), p. 17 (2015).
- [29] BARNA (B.P.), HUIZAR (I.), MALUR (A.), et al. - Carbon nanotube-induced pulmonary granulomatous disease: Twist1 and alveolar macrophage M1 activation. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, p. 23858–23871 (2013).
- [30] FRANK (E.A.), BIRCH (M.E.), YADAV (J.S.). - MyD88 mediates in vivo effector functions of alveolar macrophages in acute lung inflammatory responses to carbon nanotube exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 288, p. 322–329 (2015).
- [31] DOSTERT (C.), PETRILLI (V.), VAN BRUGGEN (R.), et al. - Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science*, 80, 320, p. 674–677 (2008).
- [32] HUSSAIN (S.), SANGTIAN (S.), ANDERSON (S.M.), et al. - Inflammasome activation in airway epithelial cells after multi-walled carbon nanotube exposure mediates a profibrotic response in lung fibroblasts. *Part. Fibre Toxicol.*, 11, p. 28 (2014).
- [33] MEUNIER (E.), COSTE (A.), OLAGNIER (D.), et al. - Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med*, 8, p. 987–995 (2012).
- [34] PEETERS (P.M.), EURLINGS (I.M.J.), PERKINS (T.N.), et al. - Silica-induced NLRP3 inflammasome activation in vitro and in rat lungs. *Part. Fibre Toxicol.*, 11, p. 58 (2014).
- [35] LAM (C-W.), JAMES (J.T.), MC CLUSKEY (R.), et al. - Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. *Toxicol. Sci.*, 77, p. 126–134 (2003).
- [36] SHVEDOVA (A.A.), KISIN (E.R.), MERCER (R), et al. - Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, 289, p. 698–708 (2005).
- [37] AISO (S.) YAMAZAKI (K.), UMEDA (Y.), et al. - Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. *Ind. Health*, 48, p. 783–795 (2010).
- [38] MULLER (J.), HUAUX (F.), MOREAU (N.), et al. - Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 207, p. 221–231 (2005).
- [39] ALLEGRI (M), PERIVOLIOTIS (D.K.), BIANCHI (M.G.), et al. - Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicol. Reports*, 3, p. 230–243 (2016).
- [40] VLASOVA (I.I.), KAPRALOV (A.A.), MICHAEL (Z.P.), et al. - Enzymatic oxidative biodegradation of nanoparticles: Mechanisms, significance and applications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 299, p. 58–69 (2016).
- [41] ZHAO (Y.), ALLEN (B.L.), STAR (A.). Enzymatic Degradation of Multiwalled Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem. A*, 115, p. 9536–9544 (2011).
- [42] CHERNOVA (T.), MURPHY (F.A.), GALAVOTTI (S.) et al. Long-Fiber Carbon Nanotubes Replicate Asbestos-Induced Mesothelioma with Disruption of the Tumor Suppressor Gene Cdkn2a (Ink4a/Arf). *Curr. Biol.*, 27, p. 3302–3314 (2017).
- [43] DONALDSON (K.), MURPHY (F.A.), DUFFIN (R.), et al. - Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review and the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part. Fibre Toxicol.*, 7, p. 5 (2010).

- [44] HUAUX (F.), d'URSEL DE BOUSIES (V.), PARENT (M-A.), et al. - Mesothelioma response to carbon nanotubes is associated with an early and selective accumulation of immunosuppressive monocytic cells. *Part. Fibre Toxicol.*, 13, p. 46 (2015).
- [45] TAKAGI (A.), HIROSE (A.), NISHIMURA (T), et al. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.*, 33, p 105–116 (2008).
- [46] NAGAI (H), OKAZAKI (Y), CHEW (S.H.), et al. - Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, p. 1330-1338 (2011).
- [47] LIANG (G.), YIN (L.), ZHANG (J.), et al. - Effects of Subchronic Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes on Mice. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A.*, 73, p. 463–470 (2010).
- [48] MULLER (J.), DELOS (M.), PANIN (N.), et al. - Absence of Carcinogenic Response to Multiwall Carbon Nanotubes in a 2-Year Bioassay in the Peritoneal Cavity of the Rat. *Toxicol. Sci.*, 110, p. 442–448 (2009).
- [49] TI MED 5050
- [50] KOYAMA (S.), ENDO (M.), KIM (Y-A.), et al. - Role of systemic T-cells and histopathological aspects after subcutaneous implantation of various carbon nanotubes in mice. *Carbon N. Y.*, 44, p. 1079–1092 (2006).
- [51] SATO (Y.), YOKOAMA (A.), SHIBATA (K.), et al. - 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. *Mol. Biosyst.*, 1, p. 176 (2005).
- [52] MURRAY (A.R.), KISIN (E), LEONARD (S.S.), et al. - Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology.*, 257, p. 161–171 (2009).
- [53] McSHAN (D.), YU (H.). - DNA damage in human skin keratinocytes caused by multi-walled carbon nanotubes with carboxylate functionalization. *Toxicol. Ind. Health*, 30(6), p. 489–498 (2014).
- [54] BARBOSA (G.M.), FAGAN (S.B.), MARTINEZ (D.S.T.), et al. - Lipopolysaccharide influences on the toxicity of oxidised multiwalled carbon nanotubes to murine splenocytes in vitro. *J. Experimental Nanosc*, 10, p. 9 (2015).
- [55] RONZANI (C.), SPIEGELHALTER (C.), VONESCH (J-L.), et al. - Lung deposition and toxicological responses evoked by multi-walled carbon nanotubes dispersed in a synthetic lung surfactant in the mouse. *Arch. Toxicol.*, 86, p. 137–149 (2012).
- [56] SALVADOR-MORALES (C.), TOWNSEND (P.), FLAHAUT (E.), et al. - Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes potential for damage to lung immune defense mechanisms. *Carbon N. Y.*, 45, p. 607-617 (2007).
- [57] ELGRABI (D.), DACHRAOUI (W.), MENARD-MOYON (C.), et al. - Carbon Nanotube Degradation in Macrophages: Live Nanoscale Monitoring and Understanding of Biological Pathway. *ACS Nano.*, 9, p. 10113–10124 (2015).
- [58] ALLEN (B.L.), KICHAMBARE (P.D.), GOU (P.), et al. - Biodegradation of Single-Walled Carbon Nanotubes through Enzymatic Catalysis. *Nano Lett.*, 8, p. 3899–3903 (2008).
- [59] KOTCHEV (G.P.), ZHAO (Y.), KAGAN (V.E.), et al. - Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65, p. 1921–1932 (2013).
- [60] ELGRABLI (D.), DACHRAOUI (W.), MARMIER (H.), et al. - Intracellular degradation of functionalized carbon nanotube/iron oxide hybrids is modulated by iron via Nrf2 pathway. *Sci. Rep.*, 7, p. 40997 (2017).
- [61] SUN (T.Y.), BORNHOFT (N.A.), HUNGERBUHLER (K), NOWACK (B.), Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials, *Environ. Sci. Technol.*, 50, p. 4701–4711 (2016).
- [62] KASEL (D.), BRADFORD (S.A.), ŠIMUNEK (J.), PUTZ (T.), VERECKEN (H.), et KLUMPP (E.), Limited transport of functionalized multi-walled carbon nanotubes in two natural soils, *Environmental Pollution*, 180, p. 152–158 (2013).

- [63] D.P. JAISI (D.P), ELIMELECH (M.), Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Limited Transport in Soil Columns, *Environ. Sci. Technol.*, 43, p 9161–9166 (2009).
- [64] LU (Y.), YANG (K.) et LIN (D.), Transport of surfactant-facilitated multiwalled carbon nanotube suspensions in columns packed with sized soil particles, *Environmental Pollution*, 192, p. 36–43 (2014).
- [65] SHAN (J.), JI (R.), YU (Y.), XIE (Z.) et YAN (X.). - Biochar, activated carbon, and carbon nanotubes have different effects on fate of ¹⁴C-catechol and microbial community in soil. *Scientific Reports*, 5, p. 16000 (2015).
- [66] GE (Y.), PRIESTER (J.H.), MORTIMER (M.), CHANG (C.H.), JI (Z.), SCHIMEL (J.P.) et HOLDEN (P.A.). - Long-Term Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes and Graphene on Microbial Communities in Dry Soil. *Environmental Science & Technology*, 50, p. 3965–3974 (2016).
- [67] SHRESTHA (B.), ANDERSON (T.A.), ACOSTA-MARTINEZ (V.), PAYTON (P.), et CAÑAS-CARRELL (J.E.). - The influence of multiwalled carbon nanotubes on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) bioavailability and toxicity to soil microbial communities in alfalfa rhizosphere. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 116, p. 143–149 (2015).
- [68] EOM (H.-J.), ROCA (C.P.), ROH (J.-Y.), CHATTERJEE (N.), JEONG (J.-S.), SHIM (I.), KIM (H.-M.), KIM (P.-J.) CHOI (K.), GIRALT (F.) et CHOI (J.). - A systems toxicology approach on the mechanism of uptake and toxicity of MWCNT in *Caenorhabditis elegans*. *Chemico-Biological Interactions*, 239, p. 153–163 (2015).
- [69] CALISI (A.), GRIMALDI (A.), LEOMANNI (A.), LIONETTO (M.G.), DONDERO (F.), SCHETTINO (T.). - Multibiomarker response in the earthworm *Eisenia fetida* as tool for assessing multi-walled carbon nanotube ecotoxicity. *Ecotoxicology*, 25, p. 677–687 (2016).
- [70] LINE (C.), LARUE (C.), et FLAHAUT (E.). - Carbon nanotubes: Impacts and behaviour in the terrestrial ecosystem - A review. *Carbon*, 123, p. 767–785 (2017).
- [71] MARTINEZ-BALLESTA (M.C.), ZAPATA (L.), CHALBI (N.) et CARVAJAL (M.). - Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *Journal of Nanobiotechnology*, 14, p. 42 (2016).
- [72] HAO (Y.), YU (F.), LV (R.), MA (C.), ZHANG (Z.), RUI (Y.), LIU (L.), CAO (W.) et XING (B.). - Carbon Nanotubes Filled with Different Ferromagnetic Alloys Affect the Growth and Development of Rice Seedlings by Changing the C:N Ratio and Plant Hormones Concentrations. *PLOS ONE*, 11 (2016).
- [73] LAHIANI (M.H.), DERVISHI (E.), IVANOV (I.), CHEN (J.) et KHODAKOVSKAYA (M.). - Comparative study of plant responses to carbon-based nanomaterials with different morphologies. *Nanotechnology*, 27 (2016).
- [74] RATNIKOVA (T.A.), PODILA (R.), RAO (A.M.) et TAYLOR (A.G.). - Tomato Seed Coat Permeability to Selected Carbon Nanomaterials and Enhancement of Germination and Seedling Growth. *The Scientific World Journal* (2015).
- [75] ZAYTSEVA (O.), WANG (Z.) et NEUMANN (G.). - Phytotoxicity of carbon nanotubes in soybean as determined by interactions with micronutrients. *Journal of Nanoparticle Research*, 19, p. 29-46 (2017).
- [76] ZHAI (G.), GUTOWSKI (S.M.), WALTERS (K.S.), YAN (B.) et SCHENOOT (J.L.). - Charge, size, and cellular selectivity for multiwall carbon nanotubes by maize and soybean. *Environmental Science & Technology*, 49, p. 7380–7390 (2015).
- [77] PARK (S.) et AHN (Y.-J.). - Multi-walled carbon nanotubes and silver nanoparticles differentially affect seed germination, chlorophyll content, and hydrogen peroxide accumulation in carrot (*Daucus carota* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, p. 257–262 (2016).
- [78] LARUE (C.), PINAULT (M.), CZARNY (B.), (2012) et al. - Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed. *J. Hazard. Mater.*, 227-228, p. 155-163 (2012).
- [79] SERAG (M.F.), KAJI (N.), GAILLARD (C.), OKAMOTO (Y.), TERASAKA (K.), JABASINI (M.), TOKESHI (M.), MIZUKAMI (H.), BIANCO (A.) et BABA (Y.). -

Trafficking and Subcellular Localization of Multiwalled Carbon Nanotubes in Plant Cells. *ACS Nano*, 5, p 493–499 (2011).

[80] BIANCO (A.), KOSTARELOS (K.) et PRATO (M.). - Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chemical Communications*, 47, p. 10182–10188 (2011).

[81] ZHAO (Y.), ALLEN (B.L.) et STAR (A.). - Enzymatic degradation of multiwalled carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115, p. 9536–9544 (2011).

[82] DIZAJ (S.M.), MENNATI (A.), JAFARI (S.), KHEZRI (K.) et ADIBKIA (K.). - Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5, p. 19-23 (2015).

[83] MOCAN (T.), MATEA (C.T.), POP (T.), MOSTEANU (O.), BUZOIANU (A.D.), SUCIU (S.), PUIA (C.), ZDREHUS (C.), IANCU (C.) et MOCAN (L.). - Carbon nanotubes as anti-bacterial agents. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, p. 3467-3479 (2017).

[84] AL-JUMAILI (A.), ALANCHERRY (S.), BAZAKA (K.), et JACOB (M.). - Review on the Antimicrobial Properties of Carbon Nanostructures. *Materials*, 10, p. 1066-1092 (2017).

[85] LIU (S.), WEI (L.), HAO (L.), FANG (N.), CHANG (M.W.), Xu (R.), YANG (Y.) et CHEN (Y.). - Sharper and Faster “Nano Darts” Kill More Bacteria: A Study of Antibacterial Activity of Individually Dispersed Pristine Single-Walled Carbon Nanotube. *ACS Nano*, 3, p. 3891–3902 (2009).

[86] KANG (S.), PINAULT (M.), PFEFFERLE (L.D.) et ELIMELECH (M.). - Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. *Langmuir*, 23, p. 8670–8673 (2007).

[87] KANG (S.), HERZBERG (M.), RODRIGUES (D.F.) et ELIMELECH (M.). - Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter!. *Langmuir*, 24, p. 6409–6413 (2008).

[88] YANG (C.), MAMOUNI (J.), TANG (Y.) et YANG (L.). - Antimicrobial Activity of Single-Walled Carbon Nanotubes: Length Effect. *Langmuir*, 26, p. 16013–16019 (2010).

[89] ARIAS (L.R.) et YANG (L.). - Inactivation of Bacterial Pathogens by Carbon Nanotubes in Suspensions. *Langmuir*, 25, p. 3003–3012 (2009).

[90] KANG (S.), MAUTER (M.S.) et ELIMELECH (M.). - Microbial Cytotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Implications for River Water and Wastewater Effluent. *Environmental Science & Technology*, 43, p. 2648–2653 (2009).

[91] SU (Y.), ZHENG (X.), CHEN (A.), CHEN (Y.), HE (G.), et CHEN (H.). - Hydroxyl functionalization of single-walled carbon nanotubes causes inhibition to the bacterial denitrification process. *Chemical Engineering Journal*, 279, p. 47–55 (2015).

[92] SEO (Y.), HWANG (J.), KIM (J.), JEONG (Y.), HWANG (M.) et CHOI (J.). - Antibacterial activity and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 9, p. 4621-4629 (2014).

[93] CHAUDHARI (A.A.), JASPER (S.L.), DOSUNMU (E.), MILLER (M.E.), ARNOLD (R.D.), SINGH (S.R.) et PILLAI (S.). - Novel pegylated silver coated carbon nanotubes kill *Salmonella* but they are non-toxic to eukaryotic cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 13, p. 13-23 (2015).

[94] ZARDINI (H.Z.), AMIRI (A.), SHANBEDI (M.), MAGHREBI (M.) et BANIADAM (M.). - Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, p. 196–202 (2012).

[95] AZIZIAN (J.), HEKMATI (M.) et DADRAS (O.G.). - Functionalization of Carboxylated Multiwall Nanotubes with Dapsone derivatives and Study of their Antibacterial Activities against *E. coli* and *S. aureus*. *Oriental Journal of Chemistry*, 30, p. 667–673 (2014).

[96] LONG (Z.), JI (J.), YANG (K.), LIN (D.), et WU (F.). - Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes’ Toxicity toward Algae. *Environmental Science & Technology*, 46, p. 8458–8466 (2012).

[97] SCHWAB (F.), BUCHELI (T.D.), LUKHELE (L.P.), MAGREZ (A.), NOWACK (B.), SIGG (L.) et KNAUER (K.). - Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration?. *Environmental Science & Technology*, 45, p. 6136–6144 (2011).

- [98] SOHN (E.K.), CHUNG (Y.S.), JOHARI (S.A.), KIM (T.G.), KIM (J.K.), LEE (J.H.), LEE (Y.H.), KANG (S.W.) et YU (I.J.). - Acute Toxicity Comparison of Single-Walled Carbon Nanotubes in Various Freshwater Organisms. *BioMed Research International*, p. 1–7 (2015).
- [99] PEREIRA (M.M.), MOUTON (L.), YEPREMIAN (C.), COUTE (A.), LO (J.), MARCONCINI (J.M.), LADEIRA (L.O.), RAPOSO (N.R.), BRANDAO (H.M.) et BRAYNER (R.). - Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cellulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Nanobiotechnology*, p. 12-15 (2014).
- [100] ZHANG (L.), LEI (C.), CHEN (J.), YANG (K.), ZHU (L.) et LIN (D.). - Effect of natural and synthetic surface coatings on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes toward green algae. *Carbon*, 83, p. 198–207 (2015).
- [101] VERNEUIL (L.), SILVESTRE (J.), MOUCHET (F.), FLAHAUT (E.), BOUTONNET (J.-C.), BOURDIOL (F.), BORTOLAMIOL (T.), BAQUE (D.), GAUTHIER (L.) et PINELLI (E.). - Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*: “A sticky story,”. *Nanotoxicology*, 9, p. 219–229 (2015).
- [102] VERNEUIL (L.), SILVESTRE (J.), RANDRIANJATOVO (I.), MARCATO-ROMAIN (C.-E.), GIRBAL-NEUHAUSSER (E.), MOUCHET (F.), FLAHAUT (E.), GAUTHIER (L.) et PINELLI (E.). - Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon*, 88, p. 113–125 (2015).
- [103] EDGINGTON (A.J.), PETERSEN (E.J.), HERZING (A.A.), PODILA (R.), RAO (A.), et KLAINE (S.J.). - Microscopic investigation of single-wall carbon nanotube uptake by *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*, 8, p. 2-10 (2014).
- [104] PETERSEN (E.J.), AKKANEN (J.), KUKKONEN (J.V.) et WEBER JR (W.J.). - Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology*, 43, p. 2969–2975 (2009).
- [105] EDGINGTON (A.J.), ROBERTS (A.P.), TAYLOR (L.M.), ALLOY (M.M.), REPERT (J.), RAO (A.M.), MAO (J.) et KLAINE (S.J.). - The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, p. 2511–2518 (2010).
- [106] ALLOY (M.M.) et ROBERTS (A.P.). - Effects of suspended multi-walled carbon nanotubes on daphnid growth and reproduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, p. 1839–1843 (2011).
- [107] STALEY (J.K.), LAIRD (J.G.), KENNEDY (A.J.) et STEEVENS (J.A.). - Sublethal effects of multiwalled carbon nanotube exposure in the invertebrate *Daphnia magna*: Sublethal effects of nanotube exposure on *Daphnia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, p. 200–204 (2016).
- [108] ALI (D.), AHMED (M.), ALARIFI (S.) et ALI (H.). - Ecotoxicity of single-wall carbon nanotubes to freshwater snail *Lymnaea luteola* L.: Impacts on oxidative stress and genotoxicity. *Environmental Toxicology*, 30, p. 674–682 (2015).
- [109] GIRARDELLO (R.), TASSELI (S.), BARANZINI (N.), VALVASSORI (R.), DE EGUILEOR (M.) et GRIMALDI (A.). - Effects of Carbon Nanotube Environmental Dispersion on an Aquatic Invertebrate, *Hirudo medicinalis*. *PLOS ONE*, 10, (2015).
- [110] GIRARDELLO (R.), BARANZINI (N.), TETTAMANTI (G.), DE EGUILEOR (M.) et GRIMALDI (A.). - Cellular responses induced by multi-walled carbon nanotubes: *in vivo* and *in vitro* studies on the medicinal leech macrophages. *Scientific Reports*, 7, p. 8871-8783 (2017).
- [111] VELZEBOER (I.), PEETERS (E.T.H.M.) et KOELMANS (A.A.). - Multiwalled Carbon Nanotubes at Environmentally Relevant Concentrations Affect the Composition of Benthic Communities. *Environmental Science & Technology*, 47, p. 7475–7482 (2013).
- [112] CHENG (J.), FLAHAUT (E.) et CHENG (S.H.). - Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, p. 708–716 (2007).
- [113] CHENG (J.), CHAN (C.M.), VECA (L.M.), POON (W.L.), CHAN (P.K.), QU (L.), SUN (Y.-P.) et CHENG (S.H.). - Acute and long-term effects after single loading of

functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*). Toxicology and Applied Pharmacology, 235, p. 216–225 (2009).

[114] HOLT (B.D.), SHAWKY (J.H.), DAHL (K.N.), DAVIDSON (L.A.) et ISLAM (M.F.). - Developing *Xenopus* embryos recover by compacting and expelling single wall carbon nanotubes. Journal of Applied Toxicology, 36, p. 579–585 (2016).

[115] HOLT (B.D.), SHAWKY (J.H.), DAHL (K.N.), DAVIDSON (L.A.) et ISLAM (M.F.). - Distribution of single wall carbon nanotubes in the *Xenopus laevis* embryo after microinjection. Journal of Applied Toxicology, 36, p. 568–578 (2016).

[116] BARBIERI (E.), CAMPOS-GARCIA (J.), MARTINEZ (D.S.T.), DA SILVA (J.R.M.C.), ALVES (O.L.) et REZENDE (K.F.O.). - Histopathological Effects on Gills of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) Exposed to Pb and Carbon Nanotubes. Microscopy and Microanalysis, 22, p. 1162–1169 (2016).

[117] MOUCHET (F.), LANDOIS (P.), PUECH (P.), PINELLI (E.), FLAHAUT (E.) et GAUTHIER (L.). - Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. Nanomedicine, 5, p. 963–974 (2010).

[118] PETERSEN (E.J.), FLORES-CERVANTES (D.X.), BUCHELI (T.D.), ELLIOTT (L.C.C.), FAGAN (J.A.), GOGOS (A.), HANNA (S.), KÄGI (R.), MANSFIELD (E.), BUSTOS (A.R.M.), PLATA (D.L.), REIPA (V.), WESTERHOFF (P.) et WINCHESTER (M.R.). - Quantification of Carbon Nanotubes in Environmental Matrices: Current Capabilities, Case Studies, and Future Prospects. Environmental Science & Technology, 50, p. 4587–4605 (2016).

[119] MAES (H.M.), STIBANY (F.), GIEFERS (S.), DANIELS (B.), DEUTSCHMANN (B.), BAUMGARTNER (W.) et SCHÄFFER (A.). - Accumulation and Distribution of Multiwalled Carbon Nanotubes in Zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science & Technology, 48, p. 12256–12264 (2014).

[120] NYEMBE (D. W) et WEPENER (V.). - Effects of Ingested Multi-Walled Carbon Nanotubes in *Poecilia reticulata*: Localization and Physiological Responses. Journal of Environmental & Analytical Toxicology, 6, p. 368–376 (2016).

[121] BOURDIOL (F.), MOUCHET (F.), PERRAULT (A.), FOURQUAUX (I.), DATAS (L.), GANCET (C.), BOUTONNET (J.-C.), PINELLI (E.), GAUTHIER (L.) et FLAHAUT (E.). - Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. Carbon, 54, p. 175–191 (2013).

[122] SARIA (R.), MOUCHET (F.), PERRAULT (A.), FLAHAUT (E.), LAPLANCHE (C.), BOUTONNET (J.-C.), PINELLI (E.), et GAUTHIER (L.). - Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 107, p. 22–29 (2014).

[123] GILBERTSON (L.M.), MELNIKOV (F.), WEHMAS (L.C.), ANASTAS (P.T.), TANGUAY (R.L.) et ZIMMERMAN (J.B.). - Toward safer multi-walled carbon nanotube design: Establishing a statistical model that relates surface charge and embryonic zebrafish mortality. Nanotoxicology, p. 1–10 (2015).

[124] MOTTIER (A.), MOUCHET (F.), LAPLANCHE (C.), CADARSI (S.), LAGIER (L.), ARNAULT (J.-C.), GIRARD (H.A.), LEON (V.), VAZQUEZ (E.), SARRIEU (C.), PINELLI (E.), GAUTHIER (L.) et FLAHAUT (E.). - Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment. Nano Letter, 16, p. 3514–3518 (2016).

[125] LAGIER (L.), MOUCHET (F.), LAPLANCHE (C.), MOTTIER (A.), CADARSI (S.), EVARISTE (L.) SARRIEU (C.), LONCHAMBON (P.), PINELLI (E.), FLAHAUT (E.) et GAUTHIER (L.). - Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians. Carbon, 119, p. 72–81 (2017).

[126] SCOWN (T.M.), VAN AERLE (R.), et TYLER (C.R.). - Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment?. Critical Reviews in Toxicology, 40, p.

653–670 (2010).

[127] BOUR (A.), MOUCHET (F.), SILVESTRE (J.), GAUTHIER (L.) et PINELLI (E.). - Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 283, p. 764-777 (2015).

[128] SCHIERZ (A.), ESPINASSE (B.), WIESNER (M.R.), BISESI (J.H.), SABO-ATTWOOD (T.) et FERGUSON (P.L.). - Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. *Environmental Science: Nano*, 1, p. 574–583 (2014).