



# Approche pluridisciplinaire de l'étude de l'activité biologique de particules fines

Najih Boumahdi

► **To cite this version:**

Najih Boumahdi. Approche pluridisciplinaire de l'étude de l'activité biologique de particules fines. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2009. Français. <tel-00419902>

**HAL Id: tel-00419902**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00419902>**

Submitted on 25 Sep 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre : 512 GP

**THESE**  
présentée par

*Najih BOUMAHDJ*

Pour obtenir le grade de Docteur  
de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

Spécialité : Génie des Procédés

**Approche pluridisciplinaire de l'étude  
de l'activité biologique de particules fines**

Soutenue à Saint-Etienne le 14 Janvier 2009

Membres du jury

Président :	Jean-Claude Nièpce	Professeur émérite, Université de Bourgogne, Dijon
Rapporteurs :	Bice Fubini	Directrice de Recherche, Université de Turin
	Jean-François Bernaudin	Professeur des universités, Pierre & Marie Curie - Paris VI
Examineur(s) :	Michèle Cottier	Professeur des universités, CHU de Saint-Etienne
	Jean-Michel Vergnon	Professeur des universités, CHU de Saint-Etienne
	Patrick Sebastien	Directeur Hygiène Industrielle, Saint-Gobain HPM, Cavaillon
Directeur(s) de thèse :	Philippe Grosseau	Maître de Recherche, Ecole des Mines de Saint-Etienne
	Bernard Guilhot	Directeur de Recherche, Ecole des Mines de Saint-Etienne

**Spécialités doctorales :**

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

**Responsables :**

J. DRIVER Directeur de recherche – Centre SMS  
 A. VAUTRIN Professeur – Centre SMS  
 G. THOMAS Professeur – Centre SPIN  
 B. GUY Maître de recherche – Centre SPIN  
 J. BOURGOIS Professeur – Centre SITE  
 E. TOUBOUL Ingénieur – Centre G2I  
 O. BOISSIER Professeur – Centre G2I  
 JC. PINOLI Professeur – Centre CIS  
 P. BURLAT Professeur – Centre G2I  
 Ph. COLLOT Professeur – Centre CMP

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

AVRIL	Stéphane	MA	Mécanique & Ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	MA	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BENABEN	Patrick	PR 2	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
BERNACHE-ASSOLANT	Didier	PR 1	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean-Pierre	MR	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaïd	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR 2	Informatique	G2I
BOUCHER	Xavier	MA	Génie Industriel	G2I
BOUDAREL	Marie-Reine	MA	Génie Industriel	DF
BOURGOIS	Jacques	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BRODHAG	Christian	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BURLAT	Patrick	PR 2	Génie industriel	G2I
CARRARO	Laurent	PR 1	Mathématiques Appliquées	G2I
COLLOT	Philippe	PR 1	Microélectronique	CMP
COURNIL	Michel	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR 1	Génie industriel	CMP
DARRIEULAT	Michel	ICM	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DECHOMETS	Roland	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
DESRAYAUD	Christophe	MA	Mécanique & Ingénierie	SMS
DELAFOSSÉ	David	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR 1	Génie Industriel	G2I
DRAPIER	Sylvain	PR 2	Mécanique & Ingénierie	SMS
DRIVER	Julian	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FOREST	Bernard	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CIS
FORMISYN	Pascal	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
FORTUNIER	Roland	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
FRACZKIEWICZ	Anna	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	CR	Génie des Procédés	SPIN
GIRARDOT	Jean-Jacques	MR	Informatique	G2I
GOEURIOT	Dominique	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GOEURIOT	Patrice	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
GROSSEAU	Philippe	MR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	MR	Génie des Procédés	SPIN
GUILHOT	Bernard	DR	Génie des Procédés	CIS
GUY	Bernard	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GUYONNET	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
HERRI	Jean-Michel	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
KLÖCKER	Helmut	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
LI	Jean-Michel	EC (CCI MP)	Microélectronique	CMP
LONDICHE	Henry	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
MOLIMARD	Jérôme	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
MONTHEILLET	Frank	DR 1 CNRS	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
PERIER-CAMBY	Laurent	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean-Charles	PR 1	Image, Vision, Signal	CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
SZAFNICKI	Konrad	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
THOMAS	Gérard	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
VALDIVIESO	François	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
VAUTRIN	Alain	PR 1	Mécanique & Ingénierie	SMS
VIRICELLE	Jean-Paul	MR	Génie des procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR 1	Génie industriel	CIS

**Glossaire :**

PR 1	Professeur 1 <sup>ère</sup> catégorie
PR 2	Professeur 2 <sup>ème</sup> catégorie
MA(MDC)	Maître assistant
DR (DR1)	Directeur de recherche
Ing.	Ingénieur
MR(DR2)	Maître de recherche
CR	Chargé de recherche
EC	Enseignant-chercheur
ICM	Ingénieur en chef des mines

**Centres :**

SMS	Sciences des Matériaux et des Structures
SPIN	Sciences des Processus Industriels et Naturels
SITE	Sciences Information et Technologies pour l'Environnement
G2I	Génie Industriel et Informatique
CMP	Centre de Microélectronique de Provence
CIS	Centre Ingénierie et Santé

# *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, Philippe Grosseau, responsable du département PMMC de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne et Bernard Guilhot directeur de recherche au Centre Ingénierie et Santé de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne pour la confiance qu'ils m'ont accordée au cours de ces trois années. Un grand merci à Michèle Cottier et Jean-Michel Vergnon pour leur encadrement et leur aide si précieuse en particulier pour leurs apports scientifiques dans le domaine médical et biologique. Je remercie également Patrick Sébastien pour son enthousiasme et son implication dans ce projet pluridisciplinaire. J'ai beaucoup appris à leur côté tant sur le plan professionnel qu'humain. Je leur témoigne toute ma gratitude et mon amitié la plus sincère.

Je remercie tout particulièrement Delphine Boudard pour sa disponibilité et sa patience durant ma formation aux techniques de biologie et de culture cellulaire.

Je suis également très reconnaissant à Bice Fubini et Jean-François Bernaudin, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse, mais aussi pour l'attention et les remarques constructives portées à ce travail. Je tiens également à remercier Jean-Claude Nièpce d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

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

J'adresse mes sincères remerciements aux personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer au cours de ma thèse et sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Les membres de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne : Gérard Thomas, Marie-Claude Bartholin, Françoise Bresson, Anne-Marie Danna, Henri Besset, Alexandre Govin, Johan Debayle, Olivier Valfort, Stéphanie Javelle, Carole Bigouraux, Marc Rouvière, Paul Jouffrey, Pierre Passet sans oublier ceux de la faculté de médecine de Saint-Etienne : Valérie Bin, Simone Piselli, Aurélien, Zigo et Farida.

Outre l'aspect professionnel, je tiens à témoigner tout mon attachement à certaines personnes avec qui j'ai eu le plaisir de partager d'excellents moments au cours de ces trois années. Je pense tout particulièrement à Laetitia, Virginie, JC, Ahmed, Yamina, Wilfried, Mancuso, Fatima-zhara, Malick, Marthe, Guillaume, Steph, Frédéric, Sébastien, Vincent, Xavier, Héli, Mélanie, Franck, Serkane... et bien sûr, pardon à tous ceux que j'ai probablement oubliés.

Enfin, je souhaite rendre un hommage tout particulier à mes parents, mes frères et sœurs. A mes parents, Ahmed et Fatima, je leur témoigne toute ma reconnaissance, mon admiration et tout mon amour. Toutes ces années d'études parachevées par cette thèse, c'est pour vous et pour l'ensemble des valeurs que vous m'avez transmis. Je mesure chaque jour tous les sacrifices qu'il vous a fallu faire et demeure admiratif de votre force et de votre courage. A Hafida, Mohamed, Abd-Samad, Latifa, mon beau-frère Magid et ma petite nièce adorée Selma, merci pour avoir été présents jusqu'à aujourd'hui.

A ma famille

« À vaincre sans péril, on triomphe sans gloire »

Cornéille, Le Cid

# TABLE DES MATIÈRES

<b>CHAPITRE I : CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE</b>	<b>1</b>
1. Notions de Risque, Danger et Exposition .....	2
2. Source de danger : les particules .....	3
2.1. Les particules.....	3
2.2. Les aérosols particulaires .....	4
3. Exposition aux particules .....	6
3.1. Principales voies d'exposition aux particules .....	6
3.2. Inhalation des particules.....	6
3.2.1. Mécanismes de dépôt dans les voies respiratoires .....	7
3.2.2. Pénétration et dépôt des particules dans les voies respiratoires.....	8
4. Application aux poudres de Carbure de Silicium.....	12
4.1. Le carbure de silicium .....	13
4.1.1. Propriétés générales du carbure de silicium.....	13
4.1.2. Structure cristallographique .....	14
4.1.3. La Notation de Ramsdell.....	14
4.1.4. Stabilité thermique des polytypes .....	16
4.2. Procédé de synthèse des poudres de SiC : procédé Acheson.....	17
4.2.1. Le procédé Acheson .....	17
4.2.2. Nature des poudres obtenues et applications.....	19
4.2.3. Inconvénients du procédé de synthèse des poudres de SiC.....	20
4.2.4. Voies d'amélioration du procédé Acheson .....	21
4.3. Dissémination des poussières dans les locaux industriels.....	23
4.3.1. Concentrations en particules dans les aérosols des usines de SiC .....	24
4.3.2. Caractérisation des aérosols .....	26
4.3.3. Etudes épidémiologiques.....	26
4.3.4. La biométrieologie .....	28
4.3.5. Ambiguïté sur l'interprétation des résultats .....	30
5. Vers les nanoparticules.....	31
5.1. Principales voies de synthèse des nanoparticules de SiC.....	31
5.2. La pyrolyse laser .....	33



5.3. Techniques sol-gel.....	33
------------------------------	----

## CHAPITRE II : SYSTEME D'ÉTUDE ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE \_\_\_\_\_ 35

1. Description du système d'étude : les alvéoles pulmonaires.....	36
1.1. Les cellules épithéliales alvéolaires .....	38
1.2. Les macrophages alvéolaires.....	39
1.3. Autres .....	40
2. Interaction macrophage/particule.....	41
2.1. La phagocytose.....	41
2.2. Devenir des particules inhalées : clairance pulmonaire .....	43
3. Activité biologique.....	45
3.1. Etat d'inflammation : TNF- $\alpha$ .....	46
3.2. Endommagement et mort cellulaire : LDH .....	47
3.3. Stress oxydant : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , radicaux libres .....	48
4. Influence des paramètres physico-chimiques dans l'activité biologique.....	52
4.1. Paramètres physiques .....	53
4.1.1. Masse des particules.....	53
4.1.2. Nombre de particules .....	53
4.1.3. Surface et taille des particules.....	53
4.1.4. Morphologie et microtopographie.....	55
4.2. Paramètres chimiques : réactivité de surface .....	56
4.2.1. Nature et organisation des groupements chimiques.....	56
4.2.2. Structure cristallographique .....	57
4.2.3. Impuretés : espèces adsorbées, métaux.....	58
4.2.4. Radicaux de surface .....	60

## DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE \_\_\_\_\_ 61

## CHAPITRE III : MATÉRIELS ET MÉTHODES \_\_\_\_\_ 63

1. Présentation des poudres étudiées.....	63
1.1. Les poudres de SiC.....	63

1.1.1.	Particules industrielles obtenues par procédé Acheson.....	63
1.1.2.	Nanoparticules obtenues par pyrolyse laser .....	63
1.1.3.	Nanoparticules obtenues par voie sol-gel.....	64
1.2.	Les poudres témoins .....	64
2.	Techniques analytiques .....	65
2.1.	Granulométrie laser .....	66
2.2.	Microscopie Electronique à Balayage.....	67
2.3.	Mesure de la surface spécifique .....	67
2.4.	Diffraction des rayons X .....	69
2.5.	Analyses chimiques.....	70
2.6.	Analyse de surface : XPS .....	72
2.7.	Génération des radicaux libres .....	76
3.	Modification des poudres : traitement thermique oxydant.....	79
4.	Mise en place de la culture cellulaire .....	80
4.1.	Lignée de macrophages alvéolaires (MA) : RAW 264.7 .....	80
4.2.	Culture cellulaire .....	81
4.3.	Préparation des cellules et des particules .....	82
4.3.1.	Préparation des cellules .....	82
4.3.2.	Préparation des particules.....	84
4.4.	Evaluation de l'activité biologique des particules.....	85
4.4.1.	Etat d'inflammation : TNF- $\alpha$ .....	85
4.4.2.	Endommagement et mort cellulaire : LDH .....	86
4.4.3.	Stress oxydant : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	88

## CHAPITRE IV : LES PARTICULES INDUSTRIELLES 92

1.	Récupération de la fraction alvéolaire.....	93
2.	Propriétés physico-chimiques des poudres .....	97
2.1.	Paramètres physiques : taille, surface et morphologie .....	97
2.1.1.	Taille et surface .....	97
2.1.2.	Morphologie des particules .....	97
2.2.	Paramètres chimiques.....	101
2.2.1.	Analyse cristallographique .....	101
2.2.2.	Composition chimique .....	103

2.2.3.	Etat de surface des poudres .....	104
2.3.	Activité radicalaire : HO•, COO• <sup>-</sup> .....	110
3.	Activité biologique .....	115
3.1.	Etat d'inflammation : TNF- $\alpha$ .....	116
3.2.	Endommagement et mort cellulaire : LDH .....	117
3.3.	Stress oxydant : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	118
3.4.	Evolution globale de l'activité biologique .....	121
4.	Discussion .....	126
5.	Conclusion.....	132

## CHAPITRE V : TRAITEMENTS THERMIQUES OXYDANTS \_\_\_\_\_ 134

1.	Modification de la surface des particules : traitement thermique oxydant.....	135
1.1.	Oxydation du carbure de silicium .....	135
1.1.1.	Oxydation active - oxydation passive .....	135
1.1.2.	Aspect cinétique .....	137
1.1.3.	Surface des particules oxydées de SiC .....	139
1.2.	Caractérisations physico-chimiques .....	141
1.2.1.	Principales caractéristiques des particules oxydées A1 et A2.....	141
1.2.2.	Activité radicalaire : HO•, COO• <sup>-</sup> .....	148
1.3.	Activité biologique .....	153
1.3.1.	Evaluation de la réponse cellulaire (TNF- $\alpha$ , LDH et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	154
1.3.2.	Activité biologique globale .....	161
2.	Discussion .....	167
3.	Conclusion.....	169

## CHAPITRE VI : NANOPARTICULES DE SiC \_\_\_\_\_ 170

1.	Les nanoparticules de SiC .....	171
1.1.	Nanoparticules LP (pyrolyse laser) .....	171
1.2.	Nanoparticules SG (sol-gel) .....	172
2.	Propriétés physico-chimiques .....	173
2.1.	Principales caractéristiques des nanoparticules de SiC .....	173

2.2. Activité radicalaire : HO•, COO• <sup>-</sup> .....	184
3. Activité biologique .....	188
3.1. Evaluation de la réponse cellulaire (TNF- $\alpha$ , LDH et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	189
3.2. Activité biologique globale .....	193
4. Synthèse .....	198
5. Conclusion.....	200
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>201</b>
<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>206</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>207</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>230</b>

# CHAPITRE I :

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

Cette étude s'inscrit dans un contexte particulier où la France fait encore le bilan de ses victimes liées à l'amiante et où elle s'interroge sur le tout nouveau secteur en voie d'expansion des nanoparticules. Les autorités de lutte pour la santé et l'environnement, face à la pression médiatique (*Revue n° 90 Biofutur, 2008*), ne souhaitent pas que de nouveaux drames se reproduisent. Il en résulte, partout en Europe, un durcissement de la législation avec des normes restrictives de plus en plus contraignantes pour les industriels (REACH\*). Il semble donc urgent et indispensable, dans le cadre de mesures préventives, de s'intéresser à la toxicité des particules que l'on produit, afin d'en maîtriser le risque éventuel et agir en conséquence pour supprimer le danger.

Cette étude portera sur les poudres de carbure de silicium (SiC) utilisées dans l'industrie pour leurs propriétés exceptionnelles. Destinées aux applications des réfractaires, abrasifs et filtres à particules, ces poudres sont produites industriellement par le procédé Acheson. Au cours des différentes étapes de ce procédé, des particules peuvent être générées dans l'environnement de travail, inhalées et constituer un risque pour la santé, évoqué par Winslow dès 1919 (Winslow et al., 1919). Malgré de nombreuses tentatives pour réformer et pallier les inconvénients de ce procédé empirique, il fonctionne toujours comme au début du XX<sup>ème</sup> siècle et demeure l'outil de production le plus utilisé pour la synthèse de poudres microniques de SiC.

En outre, pour tenir compte de l'évolution du contexte et anticiper sur les enjeux à venir, nous élargirons notre étude au champ des nanoparticules en y incluant des poudres de SiC synthétisées par pyrolyse laser et par voie sol-gel.

---

\* REACH : nouveau règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. En vigueur depuis le 1er juin 2007, REACH a pour objectifs de mieux protéger la santé humaine et l'environnement contre les risques dus aux produits chimiques et confère à l'industrie la responsabilité d'évaluer et gérer ces risques et de fournir des informations de sécurité adéquates à leurs utilisateurs.

Afin d'aborder l'étude de l'activité biologique des poudres, on se propose de faire un rappel de certaines notions relatives aux particules et aux risques liés à leur utilisation. Par soucis de clarté pour la suite et afin d'éviter les confusions, nous entamons ce chapitre par quelques définitions.

## 1. Notions de Risque, Danger et Exposition

Evaluer un risque a pour objectif d'empêcher des effets nocifs pour la santé. Par effet nocif, nous devons entendre « *tout changement dans les fonctions de l'organisme ou dans les structures des cellules susceptible d'entraîner une maladie ou des problèmes de santé* ». Ces effets comprennent entre autres les maladies, les changements dans le fonctionnement, la croissance ou le développement de l'organisme, etc.

De manière générale, l'évaluation de risques sanitaires passe par l'identification des dangers et par la caractérisation des expositions humaines. Risque, Danger et Exposition sont alors liés par la relation suivante :

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

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

Le sens du mot « danger » demeure ambigu du fait que longtemps les dictionnaires classiques en donnaient une définition peu précise. Néanmoins, on admet que le danger correspond « *à toute source potentielle de dommage, de préjudice ou d'effet nocif à l'égard d'une chose ou d'une personne dans certaines conditions en milieu professionnel* ». Cette définition est aujourd'hui la plus courante dans le contexte de la santé et de la sécurité au travail.

« L'exposition » n'est pas explicitement définie mais reste la notion la plus simple à comprendre et qui correspond à la mise en relation avec la source de danger (aérosols particuliers, polluants, etc.). Elle dépend donc de plusieurs paramètres dont la voie, la fréquence et le degré d'exposition.

En conclusion, pour supprimer le risque, il nous faut agir sur le danger et/ou l'exposition. Dans cette étude, la source de danger sera constituée par les particules en suspension dans l'environnement de travail auxquelles l'homme est exposé.

## 2. Source de danger : les particules

La présence de particules en suspension présente une source potentielle de danger pour les individus qui y sont exposés. Aujourd'hui, la terminologie employée dans ce domaine, riche et diversifiée, résulte de nombreuses années de travail et de la collaboration de corps de métier très différents : hygiénistes, toxicologues, médecins, physico-chimistes, politiques, etc. Visant au départ à établir une base commune de discussion, elle tend à submerger le lecteur sous une foule de détails. Ainsi, nous nous efforcerons, dans cette étude, d'utiliser des termes simples visant à alléger le discours et faciliter la compréhension du sujet.

### 2.1. Les particules

Une particule est un « *objet de taille infime* » voire un « *élément solide individualisé dans une poudre et qui ne peut être subdivisé facilement par les procédés usuels connus* ». Les autorités en charge de la lutte pour la santé et l'environnement, emploient le terme générique "particules" pour désigner des polluants présents en suspension dans l'air.

D'origine naturelle (érosion, éruption volcanique, etc.) ou anthropique\* (activité industrielle, circulation automobile), les particules sont classées selon leur diamètre qui conditionne principalement le site du dépôt dans les voies respiratoires et par conséquent les effets sur la santé. Longtemps, ces effets furent considérés comme affectant essentiellement le système respiratoire (bronchites, emphysèmes\*, etc.). Aujourd'hui, la prise en compte du risque spécifique lié aux nanoparticules conduit à considérer également la possibilité de troubles cardiovasculaires, neurologiques et reproductifs.

Historiquement, le cas de l'amiante, très médiatisé, marque une réelle prise de conscience des risques encourus en milieux professionnels. Ce cas a permis de sensibiliser l'opinion publique aux risques pouvant provenir des aérosols particuliers. Ainsi, en France, plus de 35 000 personnes en sont mortes et entre 50 000 et 100 000 décès sont encore attendus d'ici 2025. Selon l'Organisation Internationale du Travail, 100 000 personnes meurent chaque année, dans le monde, du fait de l'amiante.

---

\* Anthropique : lié à l'activité humaine.

\* Emphysème : maladie des alvéoles pulmonaires caractérisée par un gonflement des alvéoles lié à la présence d'air en surpression. Cette pression excessive (provoquée par une obstruction partielle des bronches gênant l'expiration) peut provoquer la rupture des alvéoles pulmonaires.

## 2.2. Les aérosols particuliers

D'une façon générale un aérosol est défini comme étant une suspension de particules liquides ou/et solides dans un gaz et ayant une vitesse de chute négligeable. Certains exemples d'aérosols sont illustrés sur la Figure 1. Parfois, l'utilisation des termes *poussières* et *fumées* sont employés par certains auteurs pour désigner des aérosols constitués de particules solides générées respectivement par des traitements mécaniques (concassage, broyage de poudres, etc.) et par la condensation de vapeurs ou produits issus de la combustion de gaz. Les tailles de ces particules sont relativement grossières pour les poussières (jusqu'à 75  $\mu\text{m}$ ) et submicroniques pour les fumées (Hinds, 1999). D'autres font appel à la métrologie des particules en suspension, notées *PM* (*Particulate Matter*). On distingue alors les  $\text{PM}_{10}$ , les  $\text{PM}_{2,5}$  (particules fines) et les  $\text{PM}_{0,1}$  (particules ultrafines = PUF ou encore nanoparticules). Ces particules possèdent respectivement un diamètre aérodynamique\* inférieur à 10, 2,5 et 0,1  $\mu\text{m}$ .

Il apparaît d'après la Figure 1, que l'homme a toujours été exposé à des aérosols liés à son environnement et son écosystème (phénomènes météorologiques, flore, etc.). Plus tard, l'industrialisation de la société a produit de nouvelles sources d'expositions caractérisées par la génération de particules de taille toujours plus petite. Les effets sur la santé des particules inhalées en suspension dépendent de divers facteurs physico-chimiques. Parmi eux, l'un des plus importants, avec la concentration dans l'air, est la taille des particules. Ce paramètre détermine le site de dépôt dans les voies respiratoires et au-delà, conditionne la façon dont les particules interagissent avec le système biologique.

Dans ce contexte de perpétuelle innovation technologique, l'homme est exposé à des particules de taille toujours plus petite. On comprend alors pourquoi, à titre préventif, il devient essentiel d'en évaluer le risque. Pour ce faire, il faut comprendre comment se déroule l'exposition de l'homme à ces particules afin de pouvoir établir une méthodologie de travail permettant d'évaluer l'activité biologique de ces particules.

\* Diamètre aérodynamique : diamètre d'une particule sphérique virtuelle de densité 1  $\text{g/cm}^3$  et ayant la même vitesse de sédimentation que la particule réelle.



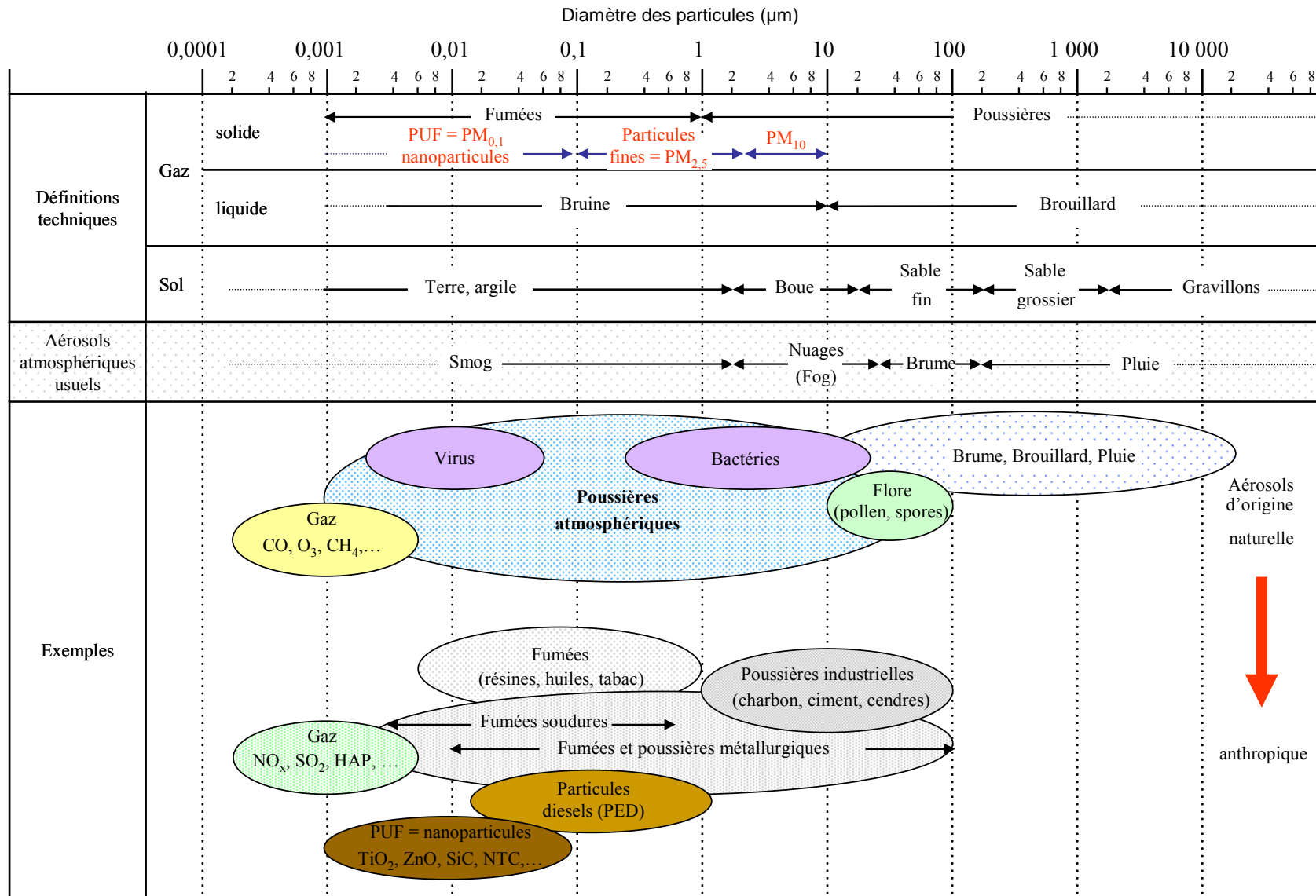


Figure 1 : Quelques exemples d'aérosols et de leur grandeur caractéristique

### 3. Exposition aux particules

Deux cas de figure peuvent se présenter : soit les particules en suspension sont arrêtées par la barrière naturelle que constitue la peau, soit elles pénètrent dans l'organisme où elles constituent alors un danger. Bien qu'il existe différentes voies d'exposition, la principale reste l'inhalation. Un état des lieux des études relatives au devenir et au comportement des particules inhalées (pénétration, dépôt, etc.) en fonction de leur taille sera réalisé. Cette démarche, nous permettra de justifier le choix des fractions granulométriques à considérer et du système biologique de l'étude (appareil respiratoire, cellules, etc.).

#### 3.1. Principales voies d'exposition aux particules

Les particules peuvent pénétrer dans l'organisme par différentes voies (Witschger, 2007). On distingue la pénétration par :

- *Inhalation* : voie principale d'exposition par le nez et/ou par la bouche, elle constitue une véritable porte d'entrée des polluants de l'air dans l'organisme.
- *Ingestion* : pénétration par les voies digestives de particules via les aliments et l'eau. Cette présence des particules dans la chaîne alimentaire (pollution des sols, additifs alimentaires, etc.) s'accroît pour les particules de petite taille (PM<sub>2,5</sub> et PM<sub>0,1</sub>).
- *Voie cutanée* : pénétration des particules par l'épiderme. Spécifique par essence aux particules ultrafines, les faibles données publiées ne concernent que des nanoparticules avec des résultats qui semblent contradictoires.
- *Voie du cerveau* : le passage vers le cerveau peut se produire soit par voie nerveuse (nerfs afférents, olfactifs) soit par voie sanguine (barrière hémato-encéphalique).

En l'état actuel des connaissances, la voie de pénétration principale des particules dans l'organisme reste les voies respiratoires. Pour notre étude, nous nous intéresserons donc principalement à l'activité biologique de particules inhalées.

#### 3.2. Inhalation des particules

Les particules inhalées pénètrent dans le système respiratoire (Figure 2) par la bouche et/ou par le nez. Pour en simplifier l'approche, le système respiratoire a été décomposé en trois

régions : la région extra-thoracique qui comprend les voies aériennes supérieures jusqu'au larynx, la région trachéo-bronchique (trachée et bronches) et la région alvéolaire (bronchioles terminales et alvéoles).

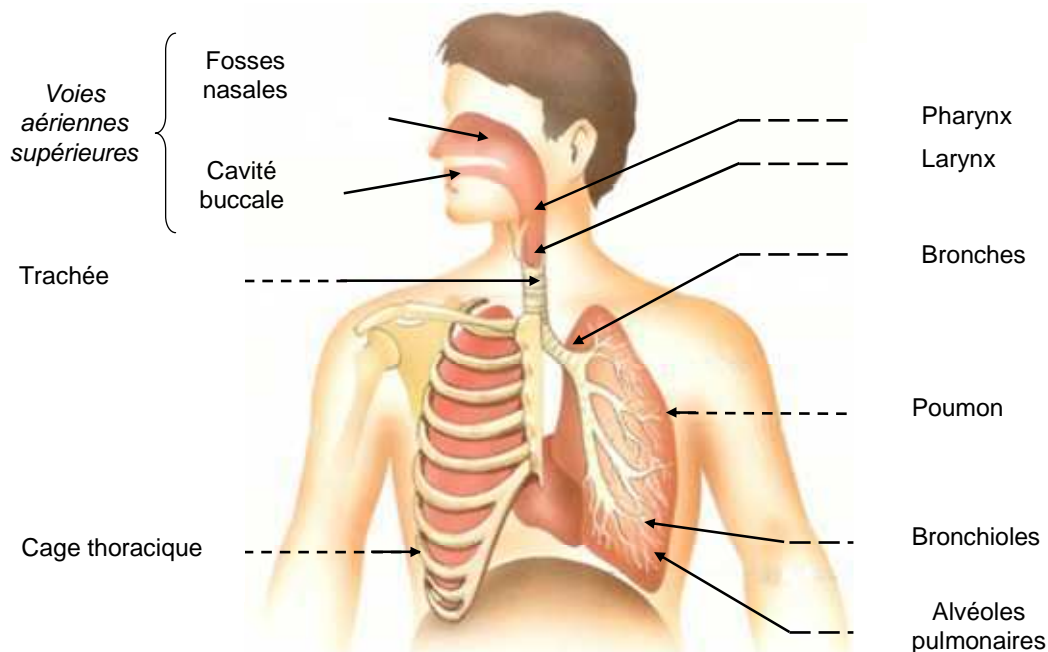


Figure 2 : Schéma de l'appareil respiratoire humain

Après leur inhalation, les particules sont véhiculées vers les différents organes du système respiratoire, en suivant les lignes du champ de vitesse dues aux mouvements de l'air. Les mécanismes de pénétration et le site de dépôt des particules dans les différentes régions pulmonaires sont influencés principalement par leurs caractéristiques (taille, morphologie, etc.).

### 3.2.1. Mécanismes de dépôt dans les voies respiratoires

Les particules inhalées peuvent soit être exhalées et rejetées vers le milieu extérieur soit se déposer dans les différentes régions par actions combinées de cinq mécanismes :

- *La sédimentation* : action de la gravité sur les particules. Son effet augmente avec la taille, la densité et la durée de résidence de la particule dans les voies respiratoires.
- *L'impaction* : liée aux brusques changements de direction des trajectoires des particules provoqués par les caractéristiques des voies respiratoires (géométrie, vitesses de l'air).

- *L'interception* : une particule est interceptée lorsqu'un élément de sa surface touche la paroi humide des voies aériennes. Ce mécanisme peut être significatif pour des particules de formes allongées telles que les fibres et beaucoup moins pour les particules sphériques.

- *La diffusion* : mouvement aléatoire des particules provoqué par les chocs des molécules de l'air sur la particule. Ce mécanisme est prédominant pour les particules de taille inférieure à 500 nm.

- *Les effets électrostatiques* : il s'agit du dépôt de particules électriquement chargées soit par attraction vers la surface ou soit par répulsion mutuelle entre particules chargées de façon unipolaire et présentes en grand nombre. Ce mécanisme de dépôt peut devenir très significatif pour les nanoparticules (Cohen et al., 1995).

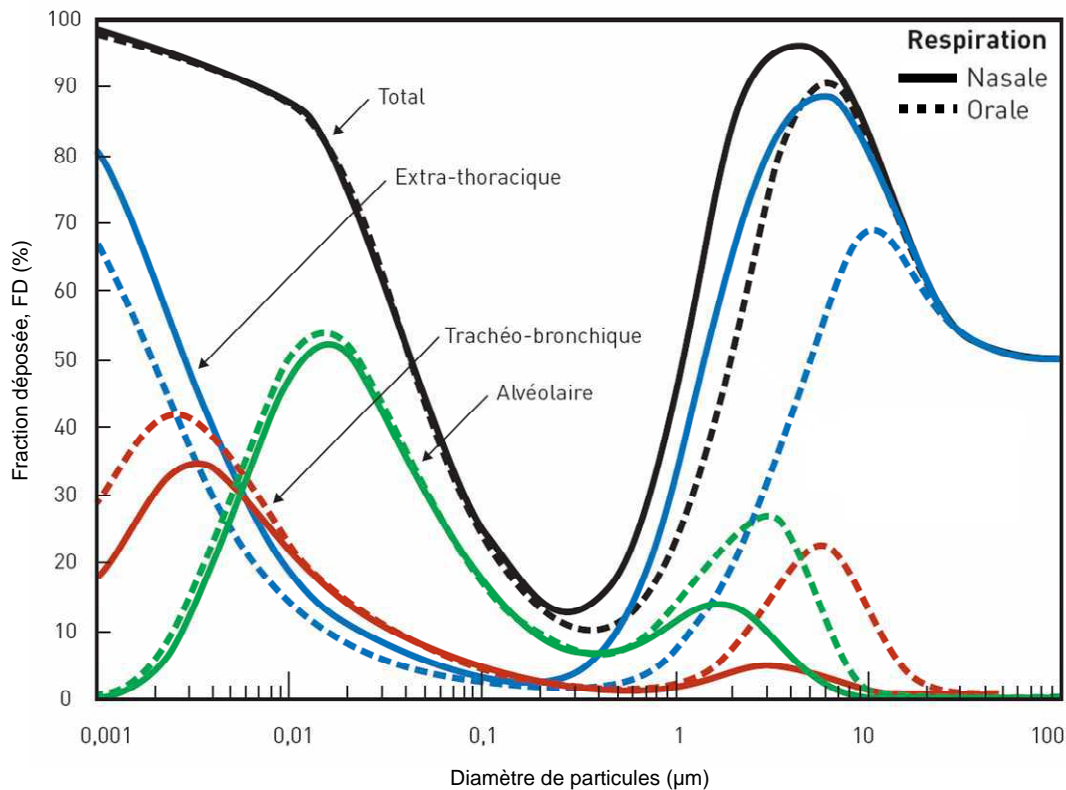
Ainsi, l'ensemble de ces mécanismes conditionne le dépôt des particules dans les voies respiratoires. En général, compte tenu de la nature des parois sur lesquelles se déposent les particules et des conditions aérauliques à l'intérieur des voies respiratoires (humidité, mucus, température, etc.), les particules déposées ne sont pas remises en suspension pour être exhalées ou redéposées sur un autre site.

### **3.2.2. Pénétration et dépôt des particules dans les voies respiratoires**

Parmi les sources disponibles, nous nous limiterons à la présentation de 2 modèles, celui de la Commission Internationale de Protection Radiologique et celui relatif à l'échantillonnage des aérosols en milieu professionnel. Ces conventions illustrent les relations entre la taille des particules et leur interaction avec le système respiratoire (pénétration, site de dépôt).

#### *Le modèle de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR, 1994)*

Le modèle de la *Commission Internationale de Protection Radiologique* (CIPR, 1994) correspond au calcul de la dose interne résultant de l'inhalation de radionucléides sous forme d'aérosols. Complet et internationalement reconnu, ce modèle décrit la probabilité de dépôt de particules dans les différentes parties de l'appareil respiratoire en fonction de leur taille et du mode de respiration (oral ou nasal) (Figure 3).



**Figure 3 : Dépôts total et régional des particules en fonction de leur diamètre (CIPR, 1994)**

L'exploitation directe de ces courbes permet de dégager plusieurs points en fonction du diamètre des particules (noté  $D$ ) :

- $D \geq 10 \mu m$  : les particules sont prépondérantes dans les régions extra-thoraciques et trachéo-bronchique où elles sont éliminées plus facilement par les voies des muqueuses\* (*drainage muco-ciliaire*).
- $D \leq 10 \mu m$  : les particules pénètrent plus profondément dans le système respiratoire et se déposent également dans les alvéoles pulmonaires et dans la région trachéo-bronchique.
- $D \leq 1 \mu m$  : (i) la présence d'un dépôt total minimum ( $\approx 20\%$ ) pour les particules de taille voisine de 300 nm. Ces dernières sont trop petites pour que les mécanismes de dépôt par sédimentation ou par impaction aient un effet, et trop grosses pour qu'elles se déposent par diffusion. Il en résulte que 80 % des particules inhalées sont rejetées dans l'air expiré. (ii) un

\* Voie des muqueuses : la muqueuse (intérieur des voies respiratoires) sécrète une substance visqueuse constituée principalement d'eau (95%) : le mucus. Recouvrant la muqueuse, ce dernier a la propriété d'engluer les particules inhalées qui s'y déposent. De plus, des cellules portant des cils vibratiles microscopiques bordent la muqueuse. Le battement de ces cils par ondes successives des alvéoles vers le larynx constitue un véritable tapis roulant (muco-ciliaire) qui entraîne les particules ayant pénétrées les voies respiratoires vers le larynx et l'œsophage. Ces dernières sont éliminées par la déglutition et les crachats (durée de l'opération : 24 à 48 h).

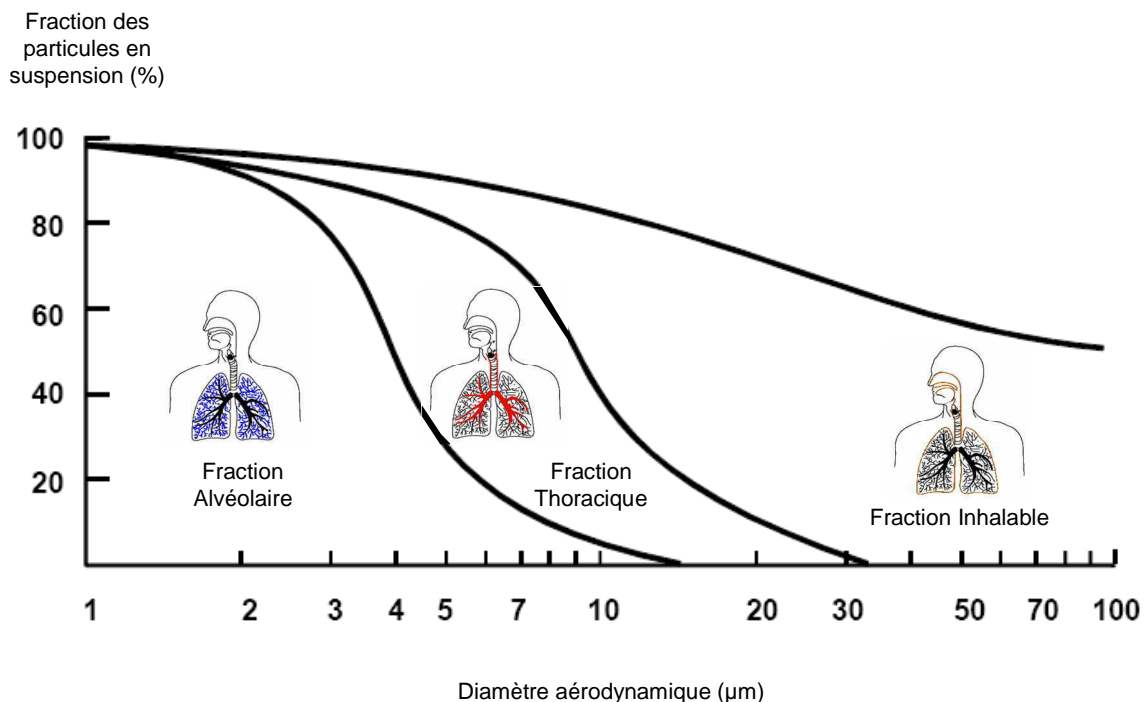
dépôt alvéolaire maximum ( $\approx 50\%$ ) pour les particules de taille proche de 20 nm. (iii) un dépôt uniforme dans les trois parties de l'appareil respiratoire pour les particules de 5-6 nm.

Conventions pour les aérosols particulaires (NF EN 481, 1993)

En ce qui concerne les aérosols, certaines méthodes se sont attachées à évaluer l'exposition en milieu professionnel. L'échantillonnage d'un aérosol permet de collecter les particules en suspension dans l'air pour les caractériser (nature, concentration, taille, évolution dans le temps) et permettre l'évaluation de l'exposition d'individus à des substances dangereuses.

Cette approche repose sur le concept de probabilité de pénétration des particules dans les voies respiratoires (Vincent, 1995). Dans ce cadre, l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) a défini des conventions au niveau international pour l'échantillonnage des aérosols en lien avec leurs effets potentiels sur la santé. Cette définition a été reprise par l'*Organisation Internationale de Normalisation* (NF ISO-7708, 1996) et une *Norme Européenne* (NF EN 481, 1993).

Les trois fractions dites *conventionnelles* illustrées sur la Figure 4, sont définies de la façon suivante :



**Figure 4 : Convention ACGIH/ISO/EN pour l'efficacité de prélèvement des aérosols, concernant les fractions inhalable, thoracique et alvéolaire**

- *Fraction inhalable* : probabilité moyenne de pénétration des particules en suspension dans les voies respiratoires, à travers le nez et la bouche pendant l'inhalation.
- *Fraction thoracique* : probabilité moyenne d'inhalation et de pénétration des particules dans les voies respiratoires au-delà du larynx;
- *Fraction alvéolaire* : probabilité moyenne d'inhalation et de pénétration des particules dans la zone alvéolaire.

Les fractions extra-thoracique et trachéo-bronchique peuvent être secondairement déterminées par calcul.

Dans cette convention, on visualise clairement la taille limite de particules que l'on peut retrouver dans les différentes régions :

- $D \leq 30 - 40 \mu\text{m}$  : les particules pénètrent dans la région trachéo-bronchique. Comme précédemment elles pourront être éliminées par le drainage muco-ciliaire.
- $D \leq 15 \mu\text{m}$  : les particules pénètrent plus profondément dans le poumon et atteignent les alvéoles pulmonaires (cellules non-ciliées) avec une probabilité d'autant plus grande que le diamètre des particules diminue. Ces particules, constituant la fraction alvéolaire, seront donc difficiles à éliminer.

### **Conclusion :**

Quel que soit le modèle considéré (CIPR ou NF EN 481) et leurs inconvénients respectifs (Witschger, 2007), les particules qui se déposent dans les régions extra-thoraciques et trachéo-bronchiques sont a priori, éliminables par l'organisme (drainage muco-ciliaire). En revanche, les particules de diamètre inférieur à quelques dizaines de microns ( $\approx 15 \mu\text{m}$ ) vont pénétrer et se déposer dans les alvéoles pulmonaires. Difficilement éliminables par l'organisme, ces particules constituant la fraction alvéolaire, vont séjourner suffisamment longtemps dans l'organisme pour pouvoir entraîner des modifications telles que des inflammations et des lésions tissulaires à l'origine de problèmes respiratoires et de cancers.

Ainsi, nous nous intéresserons essentiellement aux particules constituant la fraction alvéolaire des aérosols et aux interactions localisées dans cette région de l'appareil respiratoire.

#### 4. Application aux poudres de Carbure de Silicium

Il s'agit de présenter ici le carbure de silicium (SiC) caractérisé par des propriétés physico-chimiques exceptionnelles, notamment une grande variété de structures cristallographiques.

Non présent à l'état naturel, il est produit dans l'industrie par divers procédés. Les poudres de SiC industrielles que nous souhaitons étudier sont synthétisées par le procédé Acheson. Adapté à la production de masse, ce procédé empirique fonctionne toujours comme au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Néanmoins, il souffre de nombreux inconvénients d'un point de vue technique et environnemental. Aussi, des études ont été réalisées en vue de l'améliorer ou de trouver des solutions alternatives.

De leur synthèse à leur utilisation finale, les poudres de SiC subissent un cycle, caractérisé par de nombreuses opérations (synthèse, récupération, raffinage, etc.) qui peuvent contribuer à les mettre en suspension dans l'environnement de travail.

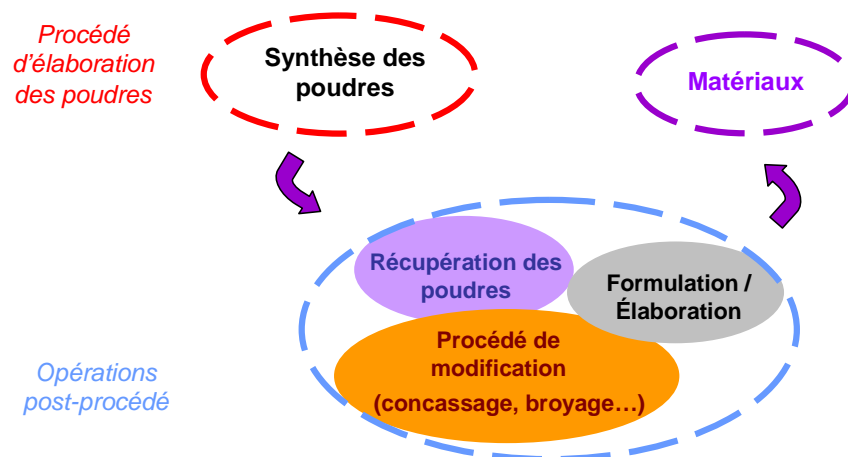


Figure 5 : Cycle général de la synthèse de poudres de SiC dans une usine

Il existe donc un risque lié à l'inhalation de ces particules qui dépend principalement des caractéristiques de l'aérosol.

De plus, des études bibliographiques relatives à l'échantillonnage des aérosols dans ce type d'environnement et les observations épidémiologiques effectuées sur des travailleurs, ont montré d'une part la complexité du problème et d'autre part l'intérêt d'approfondir les études relatives à l'activité biologique des poudres de SiC.



## 4.1. Le carbure de silicium

Dés 1824, la possibilité d'éventuelles liaisons chimiques entre le carbone et le silicium était évoquée par Jöns Jakob Berzelius. Le carbure de silicium ne fit son apparition qu'en 1892, grâce à Edward Goodrich Acheson (Acheson, 1892). Travaillant dans le domaine des abrasifs, il souhaitait à l'origine, trouver un matériau de substitution pour le diamant. Pour se faire, il réalisa plusieurs expériences dont l'une d'elle avait pour objectif d'obtenir un alliage « d'aluminium et de carbone ». Acheson plaça un mélange de carbone et de silicate d'aluminium autour d'une électrode alimentée par un courant de forte intensité. En fin de réaction, il découvre alors la présence de cristaux brillants fixés sur l'électrode de chauffe et donna à ce présumé alliage issu du corindon (*corundum*) le nom de *carborundum*. Très vite des analyses chimiques prouvèrent que cet alliage s'avéra être du carbure de silicium. Aujourd'hui, l'appellation SiC est un nom générique qui fait référence à une famille de cristaux, tous différents mais partageant certaines caractéristiques de base.

### 4.1.1. Propriétés générales du carbure de silicium

Les caractérisations physico-chimiques révèlent que le SiC présente des propriétés exceptionnelles (Tableau 1) : conductibilité thermique et électrique élevées, résistance à l'oxydation, réfractarité, inertie chimique, forte résistance mécanique, etc.

Caractéristiques physiques	SiC
Conductibilité thermique	100-200 W.m <sup>-1</sup> .°C <sup>-1</sup>
Coefficient d'expansion thermique entre 100 et 500°C	3,7 10 <sup>6</sup> .°C <sup>-1</sup>
Densité	3,2 g.cm <sup>-3</sup>
Poids moléculaire	40 g.mol <sup>-1</sup>
Solubilité dans l'eau	Insoluble
Température de frittage	2000 °C
Température de sublimation	> 2800 °C
Module de Young	4,0 10 <sup>12</sup> dyn.m <sup>-2</sup>
Dureté (Mohs)	9

**Tableau 1 : Principales caractéristiques du SiC**

### 4.1.2. Structure cristallographique

Les données cristallographiques révèlent l'existence d'une grande variété de structures cristallographiques appelées polytypes. On dénombre aujourd'hui environ 200 polytypes (Lambrecht et al., 1997). Dans ces structures, chaque atome de carbone se lie à 4 atomes de silicium pour former des tétraèdres (Figure 6).

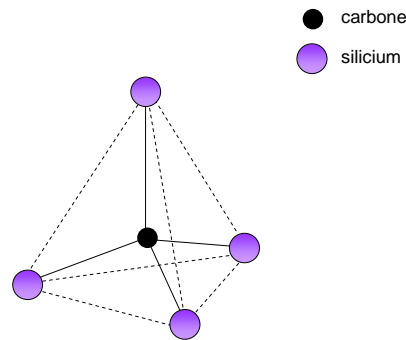


Figure 6 : Tétraèdre

Tous les polytypes de SiC sont constitués d'empilements de bicouches élémentaires qui correspondent à la superposition entre un plan compact d'atomes de silicium et de carbone. Seules des différences dans l'ordre d'empilement de ces bicouches vont expliquer et distinguer les différents polytypes. Comme le montre la Figure 7, chaque bicouche s'empile selon trois positions distinctes nommées A, B, C. En alternant périodiquement la position successive des différentes bicouches, chaque polytype devient alors parfaitement défini.

### 4.1.3. La Notation de Ramsdell

C'est la notation la plus employée (Tableau 2). Chaque polytype est noté NX où N correspond au nombre de bicouches dans la période et X la structure cristallographique (C pour Cubique, H pour Hexagonal et R pour Rhomboédrique).

Notation de Ramsdell	Nature de la phase	Séquence d'empilement selon l'axe c
3C	$\beta$	ABC...
4H	$\alpha$	ABAC...
6H		ABCACB...
15R		ABCBACABACBCACB...

Tableau 2 : Notation de Ramsdell de certains polytypes de SiC

En général, on regroupe les familles de symétrie hexagonale et rhomboédrique sous le terme générique SiC- $\alpha$  et réciproquement SiC- $\beta$  pour la seule symétrie cubique. Ainsi, les polytypes peuvent être caractérisés par la séquence de ces empilements (Figure 7).

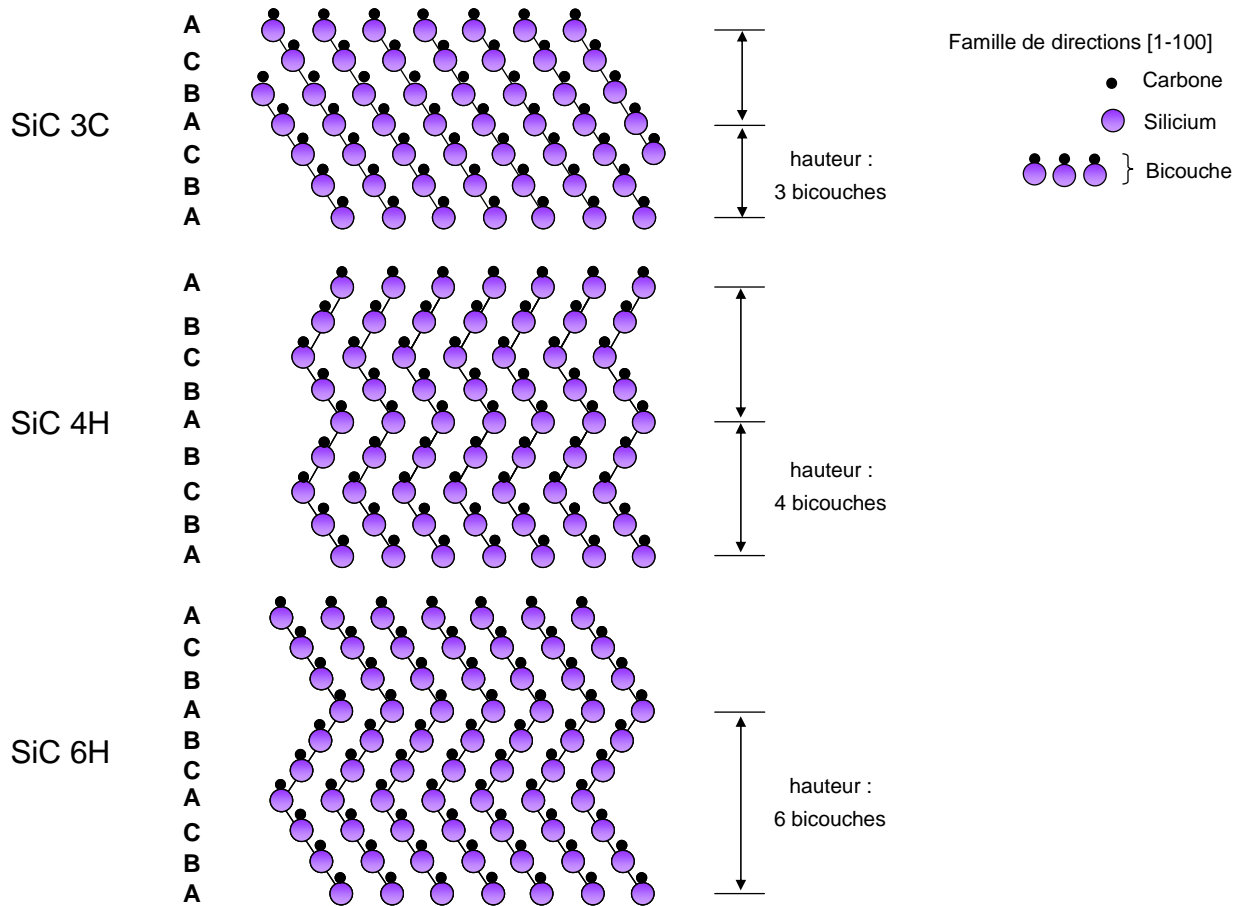


Figure 7 : Possibilités d'empilements (A, B et C) des bicouches. Illustration de quelques séquences d'empilement pour les principaux polytypes de cette étude

#### 4.1.4. Stabilité thermique des polytypes

Dans le domaine des *Technologies et Procédés de Croissance Cristalline*, la stabilité des polytypes de SiC en fonction de la température a été étudiée. Ainsi, Knippenberg (Knippenberg, 1963) établit la relation entre la structure et la température de stabilité relative des différentes occurrences de SiC (Figure 8). Le but était d'étudier les mécanismes de croissance des cristaux de SiC, les transformations de phases à l'état solide (Pandey et Krishna, 1983) et l'influence des impuretés sur la stabilité des polytypes (Hayashi, 1960 ; Knippenberg, 1963).

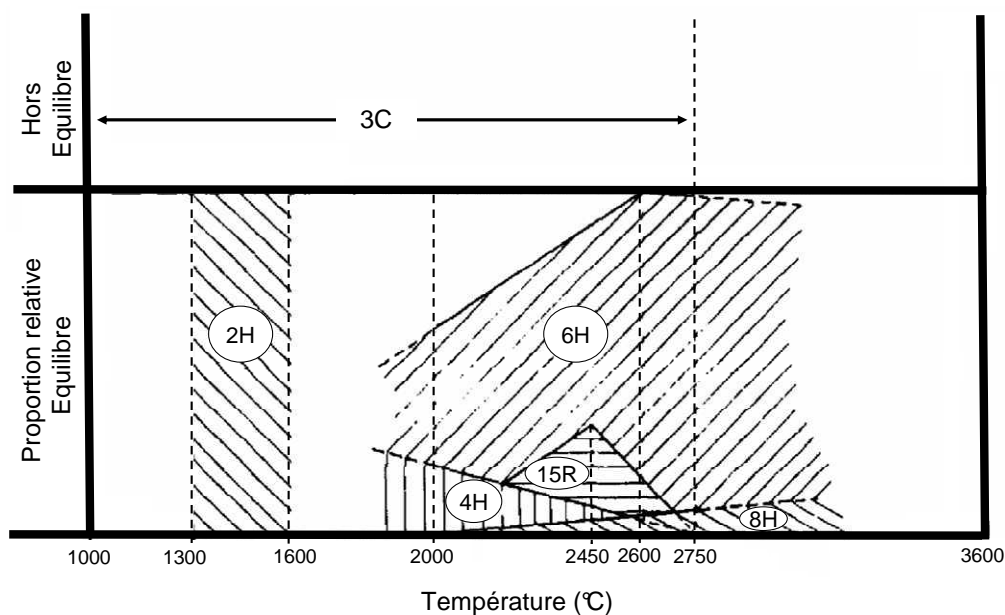


Figure 8 : Stabilité de certains polytypes du SiC en fonction de la température (Knippenberg, 1963)

Pour notre part, le domaine de fonctionnement qui attire notre attention est celui relatif à la formation des poudres de SiC par le procédé Acheson ( $T > 2000^{\circ}\text{C}$ ). Ces conditions favorisent la formation de SiC-6H plus stable au détriment des autres variétés polymorphiques (2H ou 3C). Théoriquement, les polytypes 4H et 15R peuvent être observés (Shigeyuki et Yoshizo, 1988), mais la forme 6H majoritaire reste la plus stable (Rafal, 2005). D'autre part, la forme  $\beta$  est obtenue à basse température ( $1500^{\circ}\text{C} \leq T \leq 1800^{\circ}\text{C}$ ) mais n'est pas ou très rarement observée à des températures élevées (Shigeyuki et Yoshizo, 1988).

Ainsi, le carbure de silicium a des propriétés exceptionnelles qui justifient sa demande toujours plus grande sur le marché. Comment sont donc élaborées les poudres de SiC ?

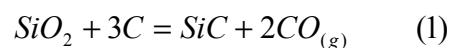
## 4.2. Procédé de synthèse des poudres de SiC : procédé Acheson

La demande en poudre de SiC a considérablement augmenté au cours des 50 dernières années et chaque année des milliers de tonnes de poudres de SiC sont synthétisées dans le monde. Le procédé industriel phare reste le « procédé Acheson » qui consiste en différentes étapes, incluant : la préparation des réactifs, le traitement thermique, la récupération des poudres et les opérations post-procédé pour finalement obtenir une poudre de SiC destinée à la commercialisation ou à être utilisée dans des matériaux hautes performances.

A chaque étape de ce procédé, des aérosols particuliers (poussières, gaz) peuvent être générés dans les locaux de travail présentant un risque pour la santé et l'environnement. Ce risque lié à l'inhalation des particules en suspension de cet environnement a été confirmé dès 1948 (Bruusgard, 1948).

### 4.2.1. Le procédé Acheson

Le SiC fut découvert en 1905 aux Etats-Unis par Ferdinand Henri Moissan dans les fragments d'une météorite trouvée à Diablo Canyon, au fond d'un cratère de l'Arizona (Moissan, 1905). A cette exception, on ne trouve pas de SiC dans la nature qui doit donc être produit industriellement pour les besoins de la technologie. Les particules de SiC relatives à cette étude sont produites par le procédé Acheson (Acheson, 1892). Ce dernier consiste à porter à haute température un mélange de silice ( $\text{SiO}_2$ ) et de coke pétrolier (C) pour obtenir la réduction carbothermique de la silice en SiC, selon la réaction (1) :



En pratique, environ 150 tonnes de mélange (Scansetti et al., 1992) sont placées dans un four électrique (Knippenberg, 1963) de part et d'autre d'une résistance en graphite (Figure 9). Pour diminuer la densité du mélange et faciliter la formation et l'évacuation des gaz, il est souvent ajouté de la sciure et/ou des sels alcalins (Smith et al., 1984 ; Scansetti et al., 1992). Par ailleurs, pour assurer une bonne isolation du mélange, des résidus provenant des traitements précédents à savoir du graphite et du « Old mix » sont ajoutés. Ce dernier est constitué de sable ( $\approx 80\%$ ) et de SiC « métallurgique » ( $\approx 20\%$ ), c'est-à-dire du SiC de mauvaise qualité (Smith et al., 1984 ; Scansetti et al., 1992).

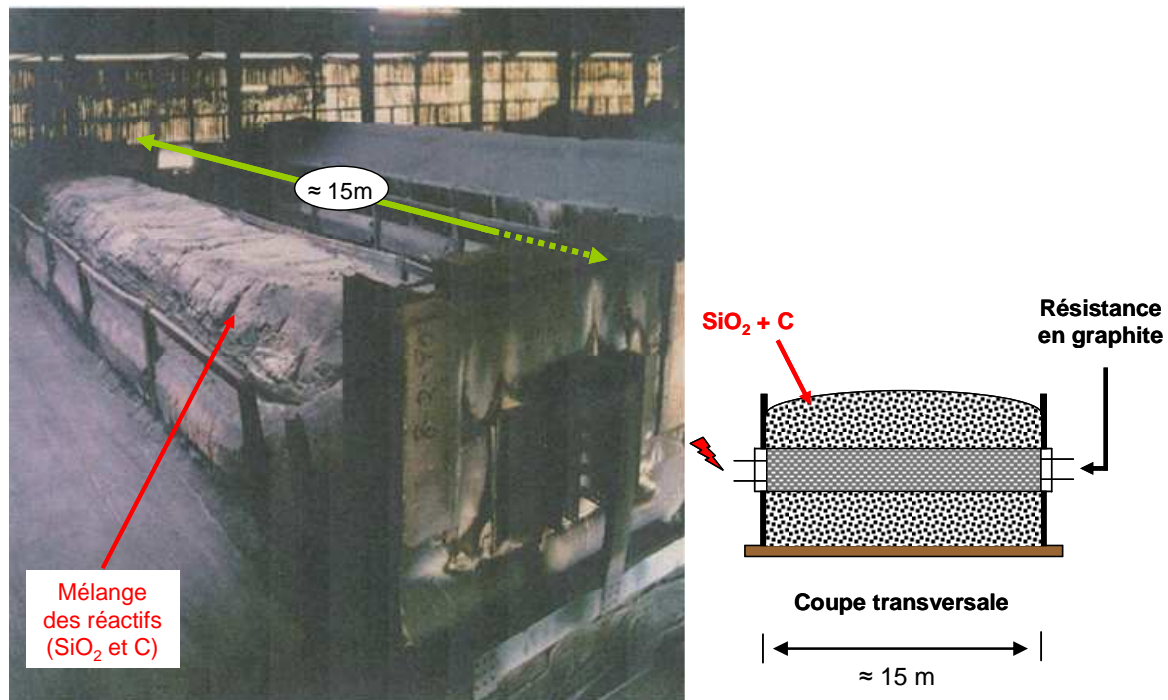


Figure 9 : Image et schéma d'un four Acheson avant traitement thermique

Le chauffage atteint des températures élevées à cœur, de l'ordre de 2000-2500° C. Il existe un gradient thermique important entre la zone de cœur où se trouve la résistance et la surface du dôme où les mesures indiquent des températures voisines de 1400°C (Scansetti et al., 1992). Une fois que la température de consigne est atteinte, cette dernière est graduellement diminuée. La cuisson peut durer de 3 à 5 jours. Lorsque le mélange réactionnel a refroidi, des opérations de récupération du SiC sont effectuées. Elles consistent principalement à briser manuellement le cylindre formé (burins pneumatiques) afin de récupérer les différents morceaux de SiC (Figure 10).

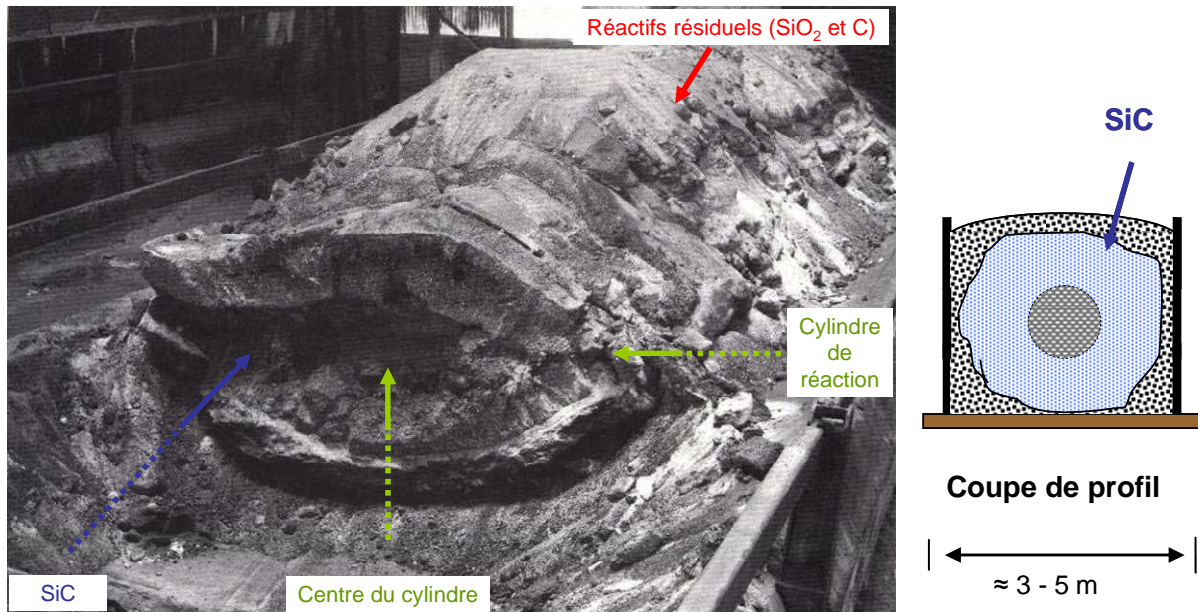


Figure 10 : Image et schéma d'un four Acheson après traitement thermique

Ces blocs sont triés en fonction de leur pureté qui diminue lorsqu'on s'éloigne du centre de la résistance. Par suite, les poudres peuvent subir une série d'opérations mécanique (concassage, broyage, tamisage, etc.), thermique et chimique (Shigeyuki et Yoshizo, 1988).

Après ces diverses opérations, les poudres de SiC sont destinées à la commercialisation ou à être utilisées en tant qu'ajout dans les matériaux hautes performances.

#### 4.2.2. Nature des poudres obtenues et applications

En sortie de procédé, la poudre obtenue est du SiC- $\alpha$ . De symétrie hexagonale, elle correspond principalement au polytype 6H. La poudre est considérée comme relativement pure (%SiC > 98%), avec une très faible surface spécifique de l'ordre de 0,1 à 1 m<sup>2</sup>/g. A l'heure actuelle, le SiC- $\alpha$  commercial fabriqué par le procédé Acheson est essentiellement utilisé comme additif dans les matériaux réfractaires et abrasifs. Depuis près d'une dizaine d'années, il a été introduit comme matériau de structure dans la fabrication des Filtres à Particules (FAP) dans les réactions de piégeage et de combustion des suies issues des moteurs Diesel (Pham-Huu et al., 1999).

### 4.2.3. Inconvénients du procédé de synthèse des poudres de SiC

Le procédé Acheson présente de nombreux avantages dus en partie à sa facilité de mise en œuvre et l'utilisation de réactifs bon marché. Il demeure très économique et adapté à la production de masse pour ce type de poudres. Cependant, dans un contexte économique de perpétuelle innovation, les nombreux inconvénients du procédé Acheson (Tableau 3) doivent aujourd'hui être pris en compte afin d'une part de trouver des solutions pour améliorer le procédé et d'autre part pour répondre à des normes (environnementales, hygiène, sécurité) de plus en plus contraignantes.

Inconvénients	Exemples
Présence de produits secondaires et de réactifs résiduels :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SiO<sub>2</sub> cristobalite (Smith et al., 1984; Romundstad et al., 2001)</li> <li>- SiO<sub>2</sub> tridymite (Scansetti et al., 1992)</li> <li>- SiO<sub>2</sub> quartz (Dufresne et al., 1987 ; Romundstad et al., 2001)</li> <li>- Whiskers* de SiC (Bye et al., 1985 ; Scansetti et al., 1992)</li> <li>- C (Dufresne et al., 1987 ; Osterman et al., 1989)</li> </ul>
Certains produits sont connus pour leur toxicité :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SiO<sub>2</sub> cristobalite (Fubini et al., 1999 ; Elias et al., 2006)</li> <li>- SiO<sub>2</sub> tridymite (Castranova et Vallyathan, 2000)</li> <li>- SiO<sub>2</sub> quartz (Bolis et al., 1983 ; Fubini, 1998 ; Bruch et al., 2004)</li> <li>- Whiskers de SiC (Bégin et al., 1989 ; Vaughan et al., 1993)</li> <li>- C (Wellmann et al., 2006 ; Baan, 2007)</li> </ul>
Libération de gaz nuisibles pour la santé et/ou l'environnement :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HAP (Dufresne et al., 1987; Petry et al., 1994)</li> <li>- SO<sub>2</sub> (Marcer et al., 1992; Romundstad et al., 2001)</li> <li>- CO (Smith et al., 1984; Romundstad et al., 2001)</li> </ul>
Lourdes opérations post-procédé :	Récupération, tris, traitements des fractions granulométriques de SiC (Shigeyuki et Yoshizo, 1988 ; Scansetti et al., 1992)

**Tableau 3 : Inconvénients du procédé Acheson.**

S'ajoute à cela, un faible contrôle des propriétés physico-chimiques des poudres ainsi formées (taille, nature et proportion des phases, impuretés chimiques, etc.). L'ensemble de ces désagréments est principalement lié au gradient thermique important lors du traitement thermique, à un temps de contact relativement long favorisant le frittage des poudres et à l'impureté des réactifs.

Pour pallier à ces inconvénients de nombreuses équipes ont cherché à faire évoluer le procédé (Bakken et al., 1998 ; Gupta et al., 2001).

\* Whiskers de SiC : nom usuel des fibres de carbure de silicium.



#### 4.2.4. Voies d'amélioration du procédé Acheson

La restriction des nouvelles normes environnementales et de santé ont conduit à considérer ce procédé, très largement répandu dans l'industrie, comme dépassé. En outre, des progrès ont été réalisés en matière de compréhension des mécanismes réactionnels (Yajima et al., 1988 ; Krishnarao, 1993; Chen et Lin, 1997 ; Chen et al., 2000 ; Gupta et al., 2001). Ainsi, lors de la réduction carbothermique de la silice par le carbone, les germes de SiC se forment sur la totalité de la surface du carbone, suivie d'une croissance rapide de ces germes dans l'ensemble du solide. Par ailleurs, la durée du traitement à haute température influence grandement la taille finale des particules de SiC. Ces principales avancées ont permis d'orienter les différents travaux qui ont conduit au développement de nouvelles méthodes visant à pallier aux inconvénients du procédé Acheson.

- *Lit fluidisé* : Kennedy et North, 1983

En 1983, ils étudièrent la réaction entre le SiO gazeux et des particules de carbone. Après une brève étude thermodynamique, ils utilisèrent l'analogie avec les lits fluidisés pour générer un flux gazeux de SiO (par réaction entre le silicium et la silice) destiné à traverser un lit de particules de carbone. Il en résulte un meilleur contrôle des propriétés des poudres de SiC ainsi synthétisées. Sur le même principe, ce système est également employé pour produire des matériaux structurés en utilisant, non plus un lit de particules, mais un solide carboné préalablement préformé selon l'application visée. Ainsi des mousses et des billes de SiC ont été obtenues sur ce principe (Shape Memory Synthesis (SMS); Pesant, 2005).

- *Rapid Carbothermal Reaction*: Weimer et al., 1994

Plus tard, en 1994, Weimer et son équipe proposèrent d'influer sur la cinétique de réaction en diminuant le temps de contact entre les réactifs (C, SiO<sub>2</sub>). Cette méthode appelé RCR pour « Rapid Carbothermal Reaction » est une technologie qui vise à obtenir du SiC en quelques secondes à partir d'un mélange de précurseurs solides de C et SiO<sub>2</sub>. Intimement lié pour faciliter la surface de contact entre les réactifs, le mélange s'écoule en un nuage de poussières à travers un tube chauffant ( $T \approx 1900^\circ\text{C}$ , capacité  $10^6\text{K/s}$ ) avec une durée de séjour inférieure à 3s. Les poudres de SiC ainsi obtenues sont submicroniques et monodisperses. L'étude cinétique réalisée par Johnson (Johnson et al., 2002) a permis d'améliorer la connaissance des mécanismes réactionnels (rendement, taille finale des particules de SiC, etc.). Aujourd'hui ce procédé vise à être développé et commercialisé pour la synthèse de poudres céramiques non-oxydes ultrafines (100 à 400 nm) à partir de précurseurs solides.

- *Procédé SINTEF* : Bakken et al., 1998

Au début des années 1990, le procédé SINTEF a été présenté comme une sérieuse alternative au procédé Acheson. Il correspond à un procédé utilisant un four rotatif totalement fermé. Les précurseurs solides (C, SiO<sub>2</sub>) sont ici introduits dans une chambre de préchauffage avant d'être introduit dans le four dont la technologie (revêtement intérieur en graphite, système de rotation, torche plasma en graphite rotative, etc.) permet de travailler à hautes températures ( $T > 2200^{\circ}\text{C}$ ), sous atmosphère contrôlée. L'alimentation en réactif se fait par la chambre de préchauffage et la récupération des produits par une chambre de refroidissement. Les poudres obtenues sont immédiatement pures (%SiC > 94%) avec quelques traces de quartz. Le système étant fermé, les gaz générés sont récupérés, recyclés, et l'énergie de ces derniers est réutilisée dans le procédé. Ainsi, ce dispositif permet d'éviter les problèmes de toxicité liés au dégagement gazeux et limite les aérosols particuliers. Des améliorations sont en cours pour améliorer la qualité des poudres de SiC obtenues.

Par suite, l'utilisation de nouveaux précurseurs (liquides, gaz) a permis d'envisager de nouvelles méthodes qui auront la contrepartie de s'éloigner des préoccupations industrielles.

Ainsi, des voies de recours sont étudiées pour améliorer la synthèse des poudres de SiC. Cependant, la substitution par un autre procédé n'est pas à prévoir dans l'immédiat en particulier car il faut répondre à des exigences industrielles en termes de coût, de rendement et de qualité de poudres obtenues qui aujourd'hui, ne sont pas pleinement satisfaites.

### 4.3. Dissémination des poussières dans les locaux industriels

Au cours des différentes étapes du procédé industriel, la mise en suspension de particules dans l'environnement de travail peut survenir et constituer un risque d'inhalation pour les travailleurs (Figure 11).

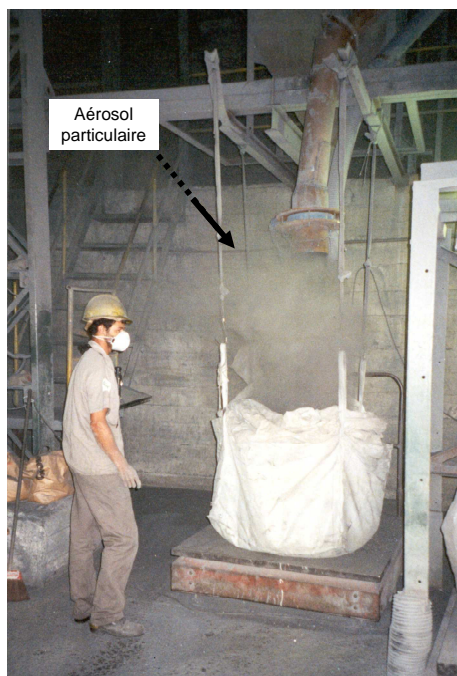


Figure 11 : Opération de remplissage des sacs par des poudres de SiC après broyage (2000)

La mise en évidence et l'évaluation rétrospective des expositions individuelles, est une étape essentielle pour faire reconnaître une maladie professionnelle et pour ainsi entamer une démarche \* d'indemnisation pour préjudices.

Ainsi, la complexité de ce genre de situation a conduit à la mise en place de base de données regroupant des informations sur les concentrations en particules dans l'air, sur l'histoire professionnelle des travailleurs et sur l'étude des échantillons biologiques (tissus, lavages broncho-alvéolaires).

\* Art. 222-19 du code pénal : le fait de causer à autrui, dans les conditions et selon les distinctions prévues par l'article 121-3, par maladresse, imprudence, inattention, négligence ou manquement à une obligation de sécurité ou de prudence imposée par la loi ou le règlement, une incapacité totale de travail pendant plus de trois mois est puni de deux ans d'emprisonnement et de 30000 euros d'amende. En cas de violation manifestement délibérée d'une obligation particulière de sécurité ou de prudence imposée par la loi ou le règlement, les peines encourues sont portées à trois ans d'emprisonnement et à 45000 euros d'amende.

### 4.3.1. Concentrations en particules dans les aérosols des usines de SiC

Par définition (Le Bihan, 2003), l'aérosol est souvent hétérogène dans sa composition chimique et variable dans le temps et l'espace. Pour le cas de la production de poudres de SiC, des descriptions détaillées d'usines au Canada (Smith et al., 1984 ; Infante-Rivard et al., 1994), en Norvège (Romundstad et al., 2001) et en Italie (Scansetti et al., 1992 ; Marcer et al., 1992), ont permis de distinguer 3 zones caractéristiques (Figure 12), à savoir :

- la zone de stockage et de préparation des réactifs : zone 1
- la zone des fours où se déroulent les traitements thermiques : zone 2
- la zone de traitements des poudres de SiC- $\alpha$  (raffinerie) : zone 3

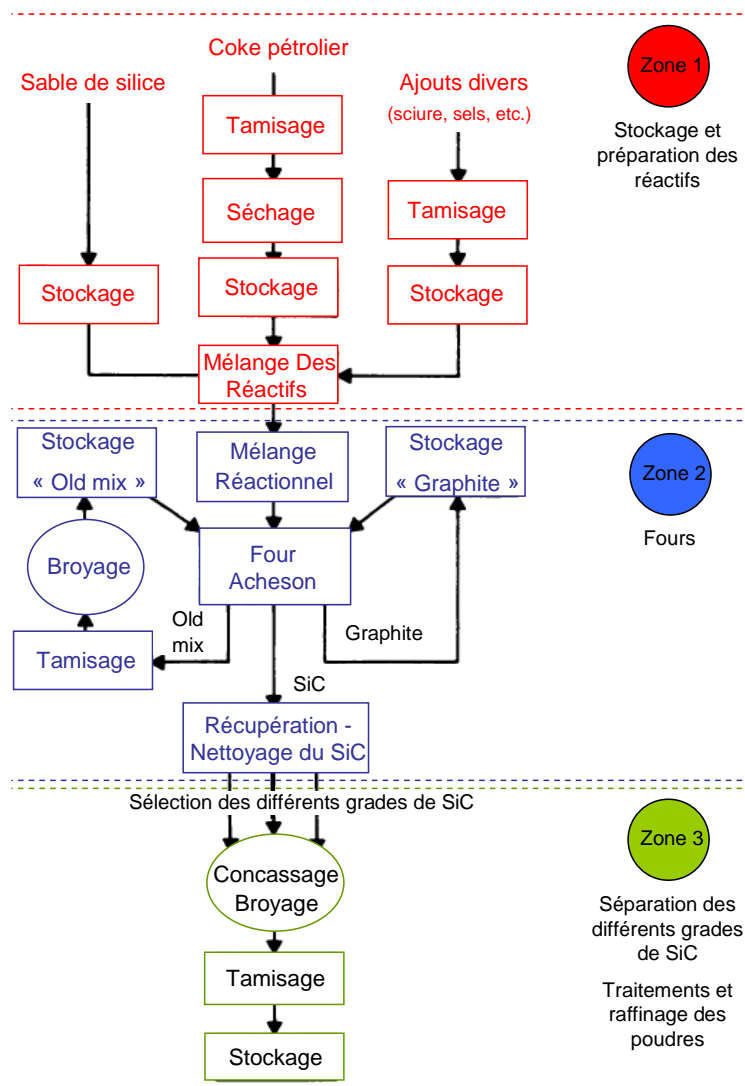


Figure 12 : Schéma détaillé d'une usine de fabrication de poudres de SiC (Smith et al., 1984)

Des mesures réalisées dans ces environnements de travail confirment la dissémination de particules de diverses natures (Tableau 4). On distingue principalement des particules de :

- *Cristobalite* : essentiellement présentes dans les zones 2 et 3 (Dufresne et al., 1987 ; Marcer et al., 1992).
- *Quartz* : présentes de manière aléatoire sur l'ensemble des sites (Smith et al., 1984 ; Dufresne et al., 1987 ; Scansetti et al., 1992) avec des concentrations relativement faibles, en général inférieures aux normes en vigueur (valeur limite d'exposition  $\leq 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Toutefois, les seuils en vigueur peuvent être atteints voire franchis (Smith et al., 1984 ; Dufresne et al., 1987).
- *Carbone* : regroupées sous le terme générique de « matières carbonées », elles sont présentes en proportion très significative (70 à  $870 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Cependant, elles restent très peu étudiées pour pouvoir en tirer des informations pertinentes (Dufresne et al., 1987 ; Osterman et al., 1989).
- *SiC* : certaines études ne font pas de distinction entre fibres et grains de SiC (Smith et al., 1984 ; Dufresne et al., 1987 ; Osterman et al., 1989). Des taux élevés ont été observés généralement voisins de  $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Pris individuellement, ce travail perd en précision avec des résultats qui semblent sous-estimer ces valeurs. Ainsi, présents principalement dans les zones 2 et 3, les whiskers de SiC (Bye et al., 1985 ; Scansetti et al., 1992 ; Romundstad et al., 2001) comme les grains de SiC (Funahashi et al., 1984 ; Romundstad et al., 2001) peuvent atteindre des concentrations de  $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

En outre, on peut noter la présence de traces de *Tridymite* (Scansetti et al., 1992), mais trop peu observées pour être considérées comme spécifique des usines de SiC et des traces de  $\text{SO}_2$  et *HAP* (*Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques*), comptabilisées dans certaines études en raison de leur potentiel élevé de toxicité (Smith et al., 1984 ; Dufresne et al., 1987 ; Marcer et al., 1992).

Particules collectées	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Références bibliographiques
SiO <sub>2</sub> Quartz	0 - 100	Smith et al., 1984 ; Dufresne et al., 1987 ; Scansetti et al., 1992
SiO <sub>2</sub> Cristobalite	0 - 36	Smith et al., 1984 ; Marcer et al., 1992 ; Romundstad et al., 2001
Matières carbonées	70 - 780	Dufresne et al., 1987 ; Osterman et al., 1989
Whiskers SiC	0 - 12	Bye et al., 1985 ; Scansetti et al., 1992 ; Romundstad et al., 2001
Grains SiC	0,2 - 12	Romundstad et al., 2001

**Tableau 4 : Synthèse bibliographique sur la nature des aérosols collectés dans diverses usines de SiC**

Ainsi, les aérosols particuliers générés dans ce type d'environnement sont polydisperses. La concentration massique totale des poussières respirables dans ce type d'environnement est très élevée, en moyenne  $60 \text{ mg}/\text{m}^3$ .

#### 4.3.2. Caractérisation des aérosols

La caractérisation des aérosols fait appel principalement à la microscopie (optique et électronique) et plus rarement à l'analyse par diffraction des rayons X. Ainsi, les rares études minéralogiques ont permis d'identifier la structure cristalline de certaines particules de :

- silice cristalline : Cristobalite (Smith et al., 1984) et Quartz (Dufresne et al., 1987) ;
- carbure de silicium : Whiskers de SiC- $\alpha$  (Bye et al., 1985), des grains de SiC- $\alpha$  et des traces de SiC- $\beta$  (Funahashi et al., 1984) ;
- carbone : Graphite (Osterman et al., 1989 ; Begin et al., 1989).

En général, les analyses granulométriques effectuées (Dufresne et al., 1987) prennent en compte la totalité de l'aérosol (fibres et grains). Les distributions granulométriques sont de fait très larges et comprises entre 0,5 et 70  $\mu\text{m}$  (Bruusgard, 1948 ; Funahashi et al., 1984 ; Dufresne et al., 1987 ; Hayashi et Kajita, 1988).

#### 4.3.3. Etudes épidémiologiques

Les études épidémiologiques consistent à évaluer les expositions aux particules à partir de l'histoire professionnelle des travailleurs (Tableau 5). Les données collectées sont ensuite traitées en utilisant des outils statistiques et classées selon leur importance en tenant compte de la fréquence, de l'intensité et de la durée du contact avec les particules (Dockery et al., 1983).

C'est en 1948 que Brussgaard souligne la présence de pneumoconioses\* chez certains travailleurs d'une usine de production de SiC en Norvège, confirmées par l'observation d'opacités\* sur des clichés radiographiques. Des incapacités à travailler ayant été prononcées pour 2 ouvriers suite à l'observation de pneumoconioses de deuxième stade.

Plus tard, ces observations seront confirmées par les analyses spirométriques (FVC, FEV<sub>1</sub>)\* d'une part (Peters et al., 1984 ; Osterman et al., 1989 ; Marcer et al., 1992) et les observations de clichés radiographiques d'autre part (Peters et al., 1984 ; Marcer et al., 1992).

En 2001, Romundstad et son équipe évoquent dans une étude détaillée, un risque global de cancer du poumon et de l'estomac. Il y souligne l'existence de corrélations directes avec l'exposition aux poussières (SiC et SiO<sub>2</sub> cristalline) et plus spécifiquement une incidence du cancer de l'estomac en rapport avec l'exposition aux particules de SiC. Son étude complémentaire, en 2002 évoquera de manière explicite l'augmentation de la mortalité par obstructions des voies respiratoires telles que l'asthme, les emphysèmes\* et les bronchites chroniques.

---

\* Pneumoconiose : terme générique désignant les affections respiratoires liées à l'inhalation de particules minérales.

\* Opacités radiographiques : zones anormalement denses du poumon apparaissant en blanc sur le fond gris foncé du poumon composé en majorité d'air. Ces zones sont constituées de secteurs pulmonaires tassés, de zones de fibrose, de dépôts minéraux et parfois de cancers. La forme des opacités est variable allant de micronodules de quelques millimètres plus ou moins nombreux jusqu'à la présence de masses de plusieurs centimètres.

\* Spirométrie : tests permettant de mesurer les débits d'air et les volumes gazeux générés par la respiration. Un débit d'expiration faible est lié au rétrécissement des bronches et s'appelle trouble obstructif (cas de l'asthme, de la BPCO, de l'emphysème). Une réduction des volumes d'air générés se nomme trouble restrictif et s'observe par exemple dans le cas des fibroses du poumon. Les principaux tests sont les suivants :

- FVC (capacité vitale forcée) : volume total d'air expiré lors d'une expiration complète et rapide dite « forcée » qui suit une inspiration maximale.

- FEV<sub>1</sub> (volume expiratoire maximum en une seconde) : volume d'air expiré pendant la première seconde d'une expiration rapide et puissante après une inspiration maximale.

\* Emphysème : maladie du poumon (et non pas des bronches) qui se traduit par la distension du parenchyme pulmonaire avec destruction des espaces alvéolaires distaux. L'affection est liée à la perte du tissu élastique pulmonaire par vieillissement accéléré.

Références bibliographiques	Lieu (pays)	Risques (fonction respiratoire / pathologies observées)
Winslow et al., 1919	USA	- Possible incidence lié à l'exposition aux particules
Clark et al., 1925/29	USA	- Aucune incidence signalée
Bruusgard 1948	Norvège	- Détection de pneumoconioses : présence d'opacités (radiographies des poumons) - pneumoconioses de stade 2.
Peters et al., 1984	USA	- Radiographies des poumons : présence d'opacités nodulaires marquées pour 24 des 171 personnes étudiées. - Corrélations entre l'exposition aux particules et d'une part les mesures spirométriques et d'autre part la nature des opacités (formes / nombres).
Edling et al., 1987	Suède	- Aucune incidence signalée.
Osterman et al., 1989	Canada	- Diminution marquée de la fonction respiratoire : baisse significative de la FEV <sub>1</sub> et de la FVC (8,2 ml et 9,4 ml d'air par année de service).
Marcer et al., 1992	Italie	- Radiographies des poumons : présence d'opacités avec un cas plus prononcé pour 1 travailleur. - Corrélations entre l'exposition aux particules et les mesures spirométriques (FVC, FEV <sub>1</sub> ).
Infante-Rivard et al., 1994	Canada	- Possibles corrélations entre baisse des fonctions respiratoires, cancer du poumon et exposition aux particules.
Romundstad et al., 2001/02	Norvège	- En 2001 : risque global de cancer du poumon et de l'estomac avec corrélation entre le risque de cancer et l'exposition aux poussières. Le cancer de l'estomac semble plus particulièrement lié à l'exposition aux particules de SiC. - En 2002 : augmentation de la mortalité par maladie obstructive bronchique.

**Tableau 5 : Synthèse bibliographique sur la nature des pathologies observées chez les travailleurs de diverses usines de production de poudres de SiC**

### **Conclusion :**

Il existe des risques caractérisés par une diminution des fonctions pulmonaires et l'apparition de pathologies respiratoires directement liées à l'exposition de particules et pouvant entraîner des maladies graves voire des cancers.

#### **4.3.4. La biométrie**

Une autre voie d'exploration consiste à s'orienter vers la « biométrie ». Ce terme désigne « l'ensemble des méthodes permettant d'étudier les expositions humaines aux polluants grâce à la mesure de ces polluants directement dans des échantillons biologiques humains ». Dans ce contexte, l'analyse d'échantillons pulmonaires (tissus, sécrétions) directement chez des



travailleurs exposés aux poussières est riche en informations (Sébastien, 1982). Difficile à mettre en place, de rares études ont été réalisées visant à identifier la présence des particules et à analyser la morphologie des tissus chez des travailleurs de ces usines (Tableau 6).

Références bibliographiques	Lieu (pays)	Risques
Funahashi et al., 1984	USA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Patient 1</u> : dyspnée – hospitalisation pour examen complet et une biopsie des poumons : emphysème discret. Une fibrose périvasculaire avec réduction de calibre des vaisseaux a été observée associée à une prolifération du tissu fibreux sous-pleural. La fibrose périvasculaire à une distribution nodulaire avec un rétrécissement des vaisseaux. Dans les tissus fibreux (pleural et sous-pleural) il a été observé une quantité de pigment anthracosique et des corps ferrugineux contenant des poussières noires (SiC) également retrouvées dans les macrophages de l'espace alvéolaire.</li> <li>- <u>Patient 2</u> : diminution de la fonction pulmonaire avec une baisse significative de la saturation artérielle suggérant une obstruction des voies aériennes centrales. Ces observations confirment une pneumoconiose avec infiltrats reticulonodulaires sur les clichés radiographiques.</li> </ul>
Hayashi et Kajita, 1988	Japon	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Patient</u> : syndromes comparables au syndrome de détresse respiratoire aiguë tuberculeux – hospitalisation et une lobectomie est pratiquée. Présence de granulomes de formes irrégulières principalement localisées autour des parois des vaisseaux sanguins et des bronchioles. Ils s'étendent aussi le long des parois alvéolaires qui de faite apparaissent plus épaisses. Ces granulomes sont constitués de phagocytes, de fibrilles et de particules minérales (pigment noir). Ils notent aussi la présence dans l'espace alvéolaire d'amas constitués de cellules, de poussières et de corps ferrugineux. Les nombreuses particules (biréfringentes), présentes sous formes d'aiguilles et de baguettes, ont été principalement localisées dans l'espace interstitiel et alvéolaire avec une abondance particulière dans les zones anthracosiques.</li> </ul>
Massé et al., 1988	Canada	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Autopsies sur 3 patients</u> : autopsies pratiquées sur 3 travailleurs ayant exercés plus de 30 ans dans une usine de production de SiC. L'analyse des tissus pulmonaires révélera la présence d'un mélange de pneumoconioses et de lésions avec les caractéristiques suivantes : abondance de macrophages intra-alvéolaires associés à un mélange de particules inhalées (SiC, C, Si, etc.) ; présence de corps ferrugineux avec en leur centre une forte concentration en pigment noir ; des nodules fibreux contenant de la silice et des corps ferrugineux associés à du carbone ; présence de fibrose interstitielle moins importante que la forme nodulaire et de quelques carcinomes.</li> </ul>

**Tableau 6 : Synthèse bibliographique sur les analyses biométriques**

Différentes des pathologies connues (silicose, asbestose, etc.), ce type de pneumoconiose observé chez les travailleurs des usines de SiC est suffisamment atypique et distinct pour être reconnu comme une entité spécifique.

#### 4.3.5. Ambiguïté sur l'interprétation des résultats

Finalement, les analyses des aérosols particuliers (concentration, nature) et les données biométriologiques réalisées sur les travailleurs des usines de SiC permettent de conclure qu'il existe un risque élevé de développer des maladies pulmonaires professionnelles dues à l'inhalation de ces particules à l'instar des observations effectuées pour les pathologies des mineurs de charbon (Hayashi et Kajita, 1988).

Néanmoins, différentes particules peuvent être inhalées simultanément et il est par conséquent très difficile de savoir quel est la part de chaque particule dans le développement de pathologies pulmonaires.

De plus, des études ont préalablement mis en évidence la toxicité de certaines particules inhalées telles que les whiskers de SiC (Jhonson et al., 1992 ; Vaughan et al., 1993), le Quartz (Fubini et al., 1998 ; Governa et al., 2005), la Cristobalite (Low et al., 1990 ; Holley et al., 1992) et le Carbone (Crosbie, 1986 ; Küpper et al., 1996 ; Barlow et al., 2005).

Bien qu'étant le composant majoritaire retrouvé dans les tissus pulmonaires (Funahashi et al., 1984), la toxicité des grains de SiC n'a été que très pauvrement étudiée avec des difficultés à tirer des conclusions nettes. Certaines études indiquent d'un coté leur faible toxicité allant même jusqu'à les considérer comme inertes (Cichy, 1989 ; Dufresne et al., 1992 ; Bruch et al., 1993) et d'un autre coté soulignent leur possible contribution aux pneumoconioses (Bruch et Rhen, 1996 ; Svensson et al., 1997 ; Petran et al., 1999).

#### **Conclusion :**

Ces résultats contradictoires illustrent clairement la nécessité de mener des expériences plus approfondies sur les poudres de SiC en conjuguant les caractérisations physico-chimiques en relation avec l'évaluation de l'activité biologique.

## **5. Vers les nanoparticules...**

La tendance du marché à évoluer vers le domaine nanométrique ouvre des perspectives exceptionnelles pour les industriels du domaine avec de vastes champs d'applications : matériaux céramiques, composites, domaine électronique, médical, etc.

### **5.1. Principales voies de synthèse des nanoparticules de SiC**

Les récents progrès portant sur les nouvelles méthodes de synthèse des nanomatériaux ont permis de proposer différentes voies de synthèse pour les nanoparticules de SiC (Tableau 7).

Méthodes	Principe	Réactifs	Caractéristiques des particules de SiC
<b>Méthodes Physiques</b>			
Pyrolyse Laser	Interaction en flux croisés entre un laser de puissance au CO <sub>2</sub> et un flux de réactifs (gaz) (Li et al., 1994 ; Leconte et al., 2007).	Silane / Acétylène SiH <sub>4</sub> /C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ; (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si(OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> /C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ...	Sphérique / monodisperse 10 nm < D* < 100 nm Sp* ≥ 30 m <sup>2</sup> /g Impuretés : C et O
Plasma	Ionisation de l'échantillon par injection dans un plasma (Ar, He), suivie de la condensation des espèces ionisées en particules ultrafines (Guo et al., 1995).	Silanes, Organo-Silanes SiO <sub>(g)</sub> /CH <sub>4</sub> ; Si/CH <sub>4</sub> ; SiCl <sub>4</sub> /CH <sub>4</sub> ...	Sphérique / monodisperse 10 nm < D < 100nm Sp ≥ 30 m <sup>2</sup> /g Impuretés : Si, C, O
Micro-ondes	Synthèse de particules sous l'action d'un champ micro-onde. Chauffage plus rapide et plus homogène du milieu. Couplage possible avec d'autres méthodes de synthèse ( <i>voie indirecte</i> ) (Dai et al., 1997 ; Satapathy et al., 2005).	- voie directe : Si/C ; SiO <sub>2</sub> /C, ... -voie indirecte : réactifs de la méthode initiale	Taille submicronique / agglomérats (D < 500nm) Sp ≤ 50 m <sup>2</sup> /g Impuretés : Si, C, O, whiskers de SiC
<b>Méthodes Chimiques</b>			
Sol-Gel	Obtention d'un gel de silice à partir d'un système {silane-H <sub>2</sub> O-catalyseur} en voie liquide suivi d'un traitement thermique (réduction carbothermique) pour obtenir les poudres de SiC (White et al., 1987 ; Seog et Kim, 1993).	Organo-Silanes PTMS : phényl triméthoxy silane PTES : phényl triéthoxy silane)...	Sphérique / submicronique 10 nm < D < 500nm Sp ≥ 30 m <sup>2</sup> /g Impuretés résiduelles : SiO <sub>2</sub> et C
Réaction en phase vapeur	Procédé CVD ( <i>Chemical Vapor Deposition</i> ) : élaboration d'un dépôt par réaction entre un ou plusieurs précurseurs (gaz) qui réagissent et/ou se décomposent à la surface d'un substrat (Kavecký et al., 2000 ; Gupta et al., 2006/2007).	SiH <sub>4</sub> /C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ; HMDS (hexaméthylsilane),...	Quelques nm à quelques μm
<b>Méthodes Mécaniques</b>			
Mécano-synthèse	Procédé de synthèse par broyage à sec de poudres grossières (1 à 50 μm) d'éléments purs. (à ce jour, résultats avec B <sub>4</sub> C : Deng et al., 2005)	Poudre de SiC	Quelques nm à quelques μm

Tableau 7 : Méthodes de synthèse de poudres fines et ultrafines de SiC

Nous présenterons de manière détaillée les méthodes utilisées pour synthétiser les nanoparticules de SiC de cette étude à savoir la pyrolyse laser et la voie sol-gel.

\* D : symbole pour le diamètre.

\* Sp : symbole pour surface spécifique.

## 5.2. La pyrolyse laser

La pyrolyse laser est une méthode qui repose sur l'interaction en jets croisés entre un faisceau laser au  $\text{CO}_2$  et un flux de réactifs (ex :  $\text{SiH}_4/\text{C}_2\text{H}_2$ ). Le transfert d'énergie résonant provoque une élévation rapide de température dans la zone de réaction par excitation des niveaux vibrationnels des molécules. Les précurseurs sont alors dissociés et une flamme apparaît dans laquelle se forment les nanoparticules. Les poudres sont ensuite refroidies par un effet de trempe et entraînées par un flux gazeux dans une zone où elles sont collectées.

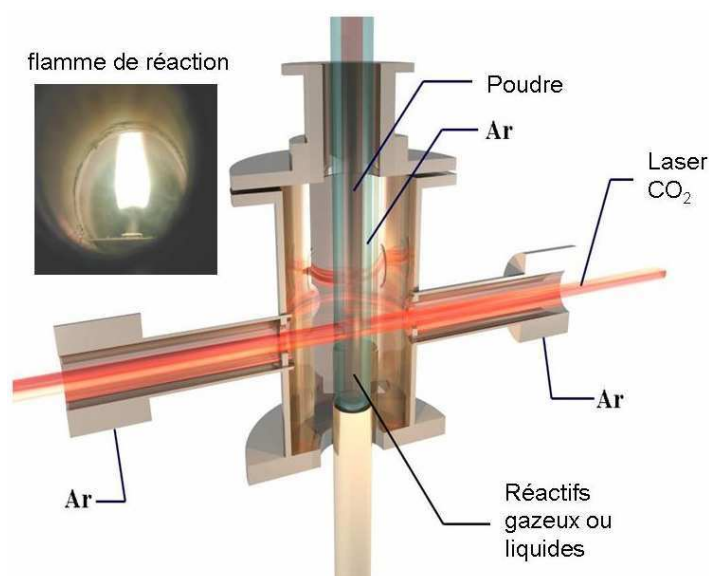


Figure 13 : Schéma du dispositif de pyrolyse laser

Parmi les avantages de cette méthode, on peut citer la réaction en flux, une grande pureté chimique des produits, essentiellement limitée par la pureté des réactifs, une bonne homogénéité physique et chimique. Les poudres sont nanométriques, de morphologie sphérique. En France, le CEA\* Saclay est spécialisé dans la synthèse de nanopoudres de  $\text{SiC-}\beta$  que nous intégrerons dans le cadre de cette étude (Boucle et al., 2005 ; Leconte et al., 2007).

## 5.3. Techniques sol-gel

La synthèse classique par voie sol-gel s'effectue à partir d'alkoxydes de Silicium de formule  $\text{Si}(\text{OR})_n$  où R est un groupement alkyle. Le principe repose sur une succession de réactions

\* CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique.

d'hydrolyse-condensation conduisant à la formation de réseaux d'oxydes (gel), pouvant être traités thermiquement par la suite. Sur ce principe, en 1987, White et son équipe utilisent avec succès le PTMS (*phényl triméthoxysilane*) pour préparer une poudre de SiC. D'autres organosilanes seront utilisés comme le PTES (*phényl triéthoxysilane*) avec des résultats similaires (Hatakaeyama et Kanzaki, 1990). L'optimisation des résultats (cinétique, contrôle des caractéristiques des poudres) conduira à ajouter un alcoxyde, le TEOS (*tétraéthoxysilane*) (Hatakaeyama et Kanzaki, 1990 ; Seog et Kim, 1993) (Figure 14).

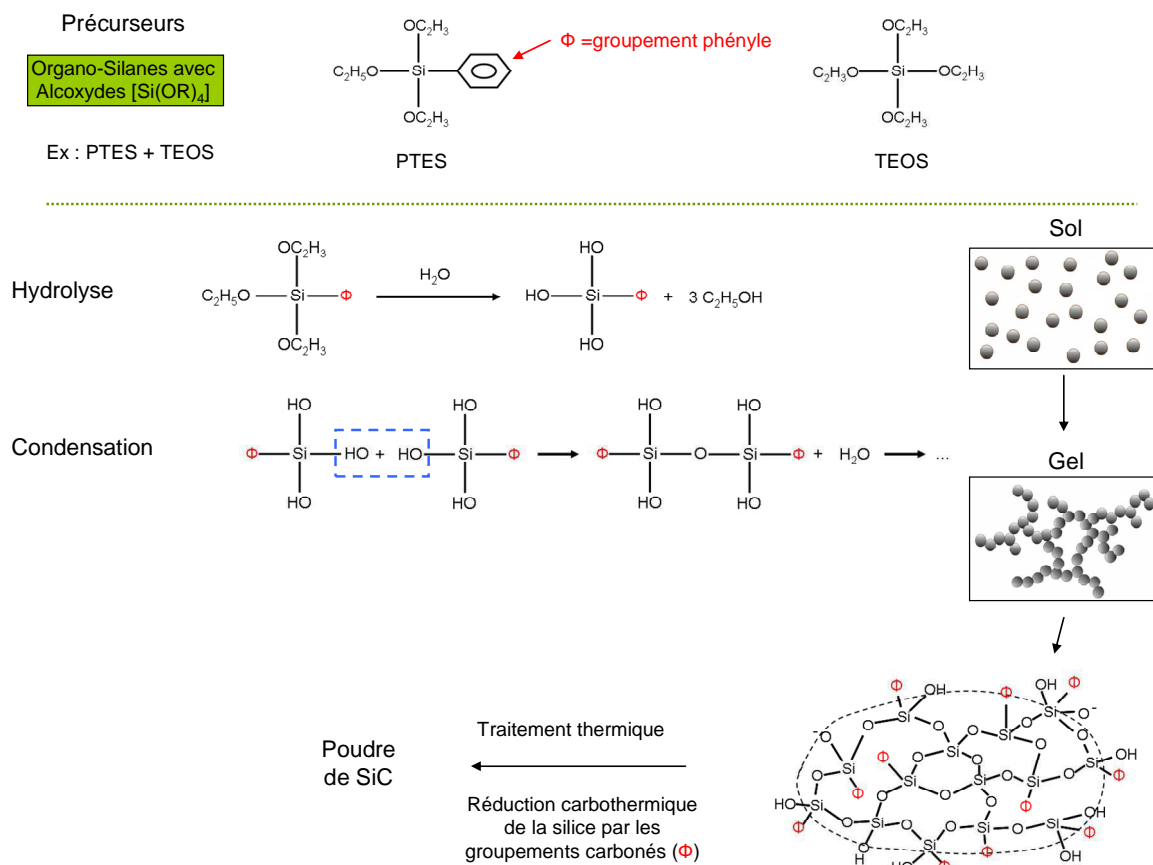


Figure 14 : Schéma du procédé sol-gel

Ainsi, en 24h à 20°C, un réseau solide tridimensionnel d'oxyde en solution est obtenu. Ces gels sont ensuite transformés en matière sèche amorphe par évacuation des solvants par simple évaporation sous vide (Hatakaeyama et Kanzaki, 1990 ; Seog et Kim, 1993). Une dernière étape, spécifique aux poudres de SiC, consiste en un traitement thermique sous argon à 1500°C pour assurer la réduction carbothermique de la silice par les atomes de carbone des groupements organiques (ex : phényl pour le PTMS, PTES) (White et al., 1987 ; Hatakaeyama et Kanzaki, 1990 ; Seog et Kim, 1993). La poudre de SiC-β obtenue est monodisperse, de morphologie sphérique avec des tailles submicroniques.

## **CHAPITRE II :**

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **SYSTEME D'ETUDE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE**

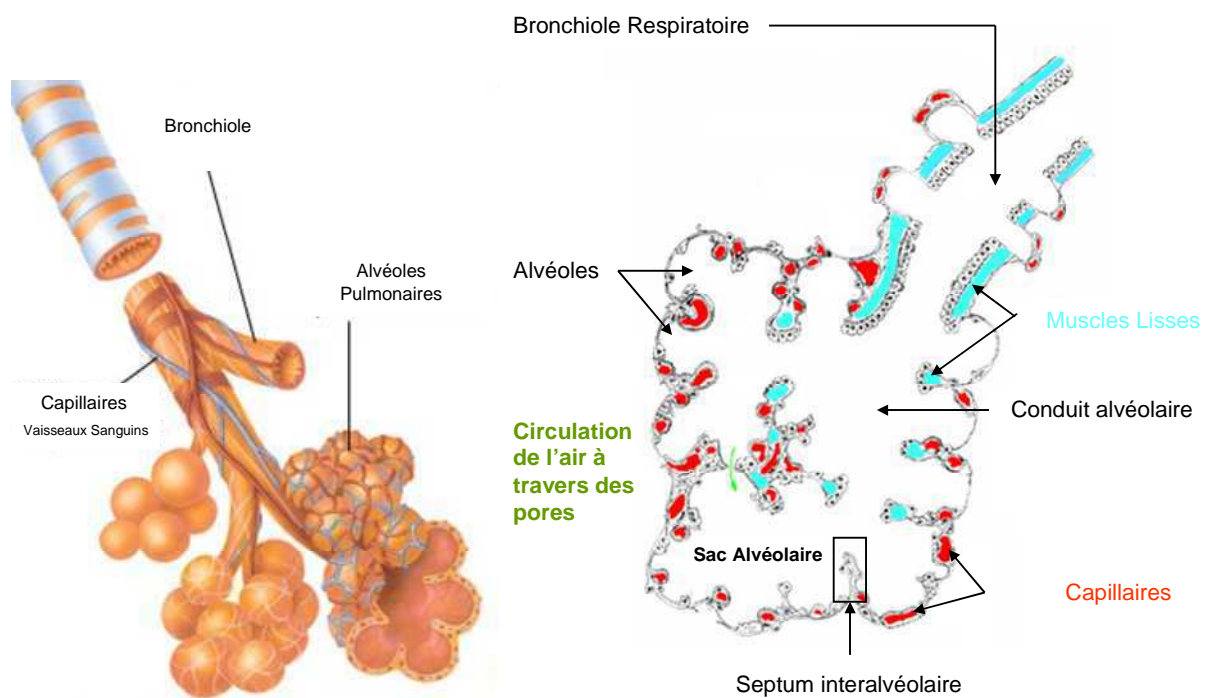
Notre système d'étude se situe au carrefour de l'activité respiratoire de l'être humain : les alvéoles pulmonaires. Dans ce système très complexe, l'organisme dispose de moyens de défense assez efficaces pour lutter contre les particules qui y pénètrent en cherchant à les évacuer de l'organisme (clairance pulmonaire).

Le principal mécanisme mis en jeu est la phagocytose par les macrophages alvéolaires qui prennent en charge leur élimination. Au cours de cette interaction particule/cellule, les macrophages vont produire différents types de molécules (cytokines, facteurs de croissance, oxydants, enzymes) dont la concentration dans le milieu va constituer un indicateur de l'activité biologique des particules inhalées. Ainsi, des paramètres spécifiques de domaines tels que l'état d'inflammation, la mort cellulaire et le stress oxydant seront étudiés. Il s'agira par cette approche, d'évaluer l'activité biologique globale des particules inhalées.

De plus, les études bibliographiques ont mis en évidence la contribution des particules dans l'apparition de lésions pulmonaires, principalement en raison de leurs caractéristiques physico-chimiques. Etudier l'activité biologique des particules est indissociable de l'étude physico-chimiques des poudres. Ainsi, nous verrons dans quelle mesure certains paramètres physiques et chimiques influencent la réponse biologique des cellules, à l'origine des effets nocifs qui apparaissent à long terme chez l'homme.

## 1. Description du système d'étude : les alvéoles pulmonaires

La zone respiratoire commence à la jonction des bronchioles terminales et respiratoires. Ces dernières se prolongent par des conduits alvéolaires, auxquels font suite les sacs alvéolaires puis les alvéoles (Figure 15). Les cloisons de séparation entre deux alvéoles pulmonaires voisines sont appelées septa interalvéolaires. C'est dans ces cloisons que passent les nombreux capillaires sanguins permettant au sang de s'oxygéner (Figure 15). Le nombre élevé des alvéoles chez l'homme ( $300 \cdot 10^6$ ) permet de développer une surface d'environ  $150 \text{ m}^2$  pour les échanges gazeux.

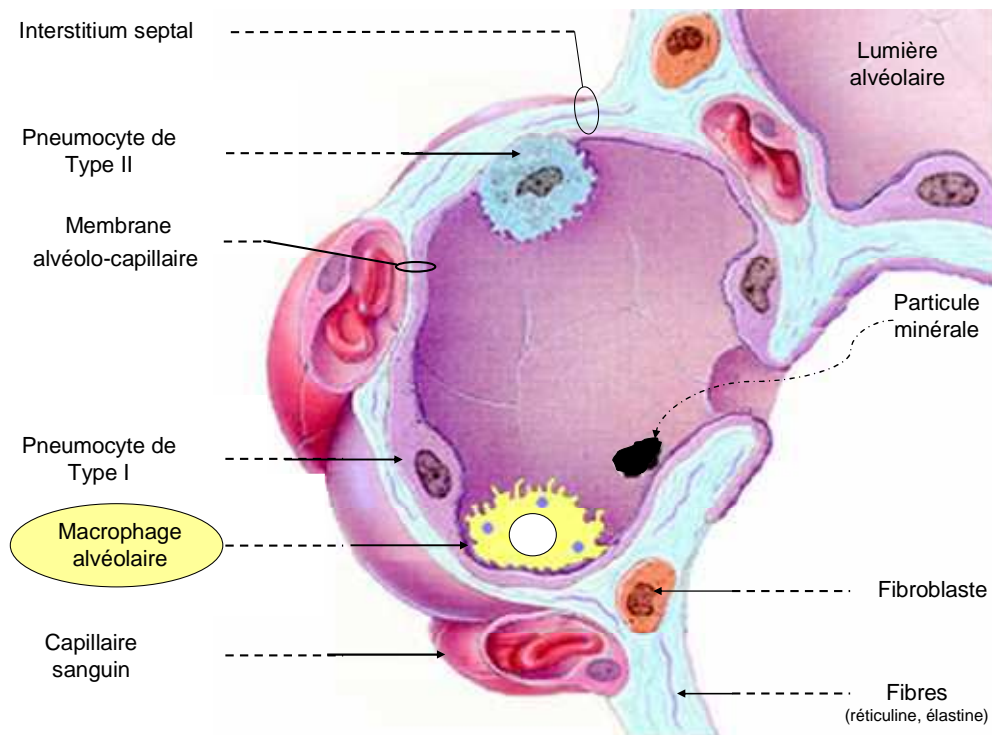


**Figure 15 : Schéma et coupe transversale d'une terminaison bronchiolaire débouchant sur des sacs alvéolaires**

Les alvéoles communiquent entre elles par des pores de diamètre n'excédant guère quelques dizaines de microns. Elles sont tapissées de différentes cellules\*, les pneumocytes I et II. (Figure 16).

\* Cellule : unité structurale, fonctionnelle et reproductrice constituant tout ou partie d'un être vivant. Un schéma détaillé d'une cellule est fourni en Annexe (cf. Annexe A).





**Figure 16 : Schéma de coupe d'une alvéole. Visualisation d'une particule minérale déposée dans une cavité alvéolaire**

La cloison interalvéolaire est continue mais présente de minuscules pores (pores de Kohn, 8 nm de diamètre) dans la cloison qui permettent la régulation de la pression et la circulation de l'air entre les alvéoles. L'interstitium septal représente le squelette conjonctif élastique du poumon. Il est composé de quelques fibroblastes\* et de fibres de réticuline et d'élastine qui confèrent les propriétés remarquables d'extension et de contraction indispensables aux changements de volume des poumons lors du cycle respiratoire.

Le système alvéolaire est très vascularisé (Figure 15 et Figure 16) avec des capillaires formés de cellules endothéliales de 7 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre qui entourent les alvéoles à la manière de corbeilles et pénètrent dans les cloisons interalvéolaires. La barrière « alvéolo-capillaire », entre le capillaire et la cloison alvéolaire, d'une épaisseur de 0,35  $\mu\text{m}$ , constitue l'interface entre l'air et le sang et permet les échanges gazeux qui se produisent par diffusion.

\* Fibroblastes : cellules en forme de fuseaux ou d'étoiles possédant de longs prolongements cytoplasmiques. Elles synthétisent d'une part les protéines de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif et d'autre part sont capables de sécréter de nombreuses autres molécules (cytokines, facteurs de croissance, enzymes) jouant ainsi un rôle important dans les processus de réparation tissulaire et dans l'entretien des réactions inflammatoires.

Ainsi, lorsqu'une particule inhalée se dépose dans une alvéole pulmonaire, elle se retrouve dans un environnement délimité par les cellules épithéliales (pneumocytes de type I et II) où elle y rencontre les macrophages alvéolaires (Figure 16).

### 1.1. Les cellules épithéliales alvéolaires

Les parois des alvéoles sont constituées d'un épithélium\* de revêtement pavimenteux simple composé de deux types cellulaires, les pneumocytes de type I et II étroitement unis par de nombreux systèmes de jonction et reposant sur une membrane basale\*.

- *Les pneumocytes I* : leur cytoplasme très étendu (Figure 16) forme un voile très fin qui leur confère une grande surface ( $\approx 90\%$  de la surface de l'alvéole) beaucoup plus importante que celle des pneumocytes II ( $\approx 10\%$ ).

- *Les pneumocytes II* : de forme cuboïde ou arrondie, ces cellules sont orientées vers la lumière alvéolaire et présentent de courtes microvillosités en surface. Elles reposent sur la membrane basale et sont étroitement unies aux pneumocytes I voisins par de nombreux systèmes de jonction. Elles sont constituées d'un noyau central arrondi clair et d'un cytoplasme riche en grains de sécrétion, composés de phospholipides et de protéines à l'origine du surfactant. Le surfactant, sécrété en permanence dans la lumière alvéolaire, s'étale en un film de  $0,2 \mu\text{m}$  d'épaisseur sur la face interne de l'alvéole. Agissant comme un véritable tensio-actif, son rôle principal est de réduire la tension superficielle air/liquide créée par la fine couche de liquide se trouvant à la surface des alvéoles pulmonaires. Il empêche le collapsus des alvéoles lors de l'expiration (Vives Plourde, 2007). En outre, en cas de lésions du tissu respiratoire, les pneumocytes II sont capables de régénérer la paroi alvéolaire en se divisant, puis en se différenciant en pneumocytes I.

---

\* Épithélium : terme général désignant le tissu fondamental assurant la séparation entre l'intérieur de l'organisme et le milieu l'extérieur. Les épithéliums tapissent les organes creux de l'organisme et participent à la formation de la peau.

\* La membrane basale : elle correspond à une matrice extracellulaire particulière que l'on trouve à l'interface entre un épithélium et un autre tissu. Sa perméabilité régule les échanges de molécules, en particulier de nutriments, entre les deux tissus. Elle contribue également à la cohésion structurale de l'épithélium. Elle est constituée d'une lame basale d'origine épithéliale et d'une lame réticulaire d'origine conjonctive.

## 1.2. Les macrophages alvéolaires

Présents dans la lumière de l'alvéole, les macrophages sont des cellules qui appartiennent à la famille des leucocytes\*. De 20 à 80 µm de diamètre, ils présentent un grand noyau arrondi ou ovalaire et la majeure partie de la cellule est composée de cytoplasme (Figure 17). Ils proviennent de monocytes du sang qui ont gagné l'espace septal puis les lumières alvéolaires.

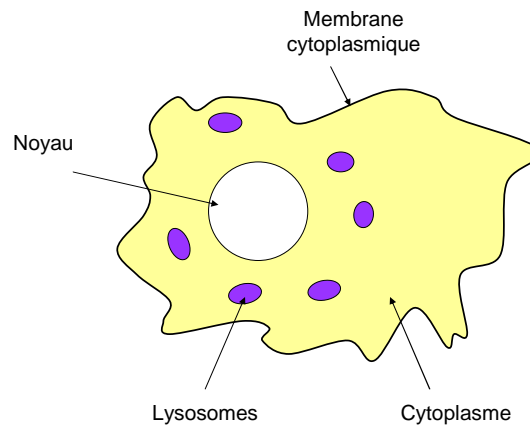


Figure 17 : Schéma d'un macrophage et de ses constituants

Ils sont fixés à la membrane des pneumocytes I grâce à des récepteurs (fibronectine), eux-mêmes présents sur ces pneumocytes, assurant leurs déplacements dans la lumière alvéolaire. Ces cellules présentent des capacités phagocytaires accrues par rapport à celles des autres macrophages de l'organisme. Elles leur permettent de capter tous les corps étrangers qui arrivent dans l'alvéole (poussières organiques et inorganiques, bactéries, parasites divers, etc.). Ces derniers peuvent être soit véhiculés dans les vaisseaux lymphatiques situés dans l'interstitium, soit entraînés par les gaz alvéolaires dans les bronchioles, les bronches et la trachée pour être déglutis ou expectorés au niveau du pharynx. Ce mécanisme élimine des poumons plus de deux millions de macrophages alvéolaires par heure. D'autres cellules inflammatoires peuvent s'observer dans le tissu interalvéolaire (polynucléaires, lymphocytes, plasmocytes, mastocytes). S'introduisant par diapédèse† (cf. Annexe B), leur afflux dépend de l'état inflammatoire ou infectieux des poumons.

\* Leucocytes : nom générique des globules blancs.

† Diapédèse : mécanisme de traversée des barrières endothéliales par les cellules pour rejoindre le lieu de l'inflammation. La traversée s'effectue dans les jonctions intercellulaires; elle est contrôlée par des récepteurs sur les endothéliums, et augmentée en cas d'inflammation (chimiotactisme et relâchement des jonctions). Ce mécanisme assure les passages des leucocytes entre le sang et les tissus.

### 1.3. Autres

Suite au déclenchement de la réaction entre particules et macrophages d'autres cellules pourront se retrouver dans le tissu interalvéolaire (polynucléaires, basophiles, lymphocytes, etc.). Certaines d'entre elles possèdent de la même façon que le macrophage la capacité de phagocyter les particules étrangères, comme les polynucléaires neutrophiles (*PMN*). Ces derniers représentent environ 65% des globules blancs et exercent leurs fonctions tout particulièrement dans les zones inflammatoires. Leur durée de vie est courte, inférieure à 24 heures, avant d'être à leur tour phagocytés par les macrophages.

#### **Conclusion :**

Le système d'étude, défini par la cavité alvéolaire, est très complexe dans la réalité. Par conséquent, on ne peut pas reproduire avec certitude l'environnement réel mais seulement se contenter d'une approche simplifiée qui vise à étudier un type cellulaire. Représentant la première ligne de défense face aux particules inhalées, nous choisirons de travailler avec des macrophages.

Il nous reste à voir comment le macrophage alvéolaire participe et module la réaction inflammatoire locale.

## 2. Interaction macrophage/particule

Première ligne de défense face aux particules inhalées, le macrophage alvéolaire interagit avec la particule. La cellule se déplace via ses pseudopodes\* pour englober la particule par un mécanisme que l'on appelle la phagocytose. Le but est d'éliminer la particule de l'organisme. Nous nous intéresserons principalement à cette interaction et à l'élimination des particules.

### 2.1. La phagocytose

Le phénomène de phagocytose est le principal moyen de défense de l'organisme contre les agents pathogènes (particules minérales, virus, bactéries, etc.). Il s'agit d'un mécanisme par lequel une particule est captée à l'intérieur de la cellule en plusieurs étapes (Figure 18).

- 1 *Etape de reconnaissance* : la particule est identifiée comme un agent étranger (« non-soi ») par le macrophage qui se déplace vers sa direction.
  - 2 *Etape d'internalisation de la particule* : mécanisme par lequel le macrophage, via ses pseudopodes, adhère et entoure la particule. Ces derniers fusionnent pour former une vacuole intra-cytoplasmique : le phagosome (Greenberg et Silverstein, 1993).
  - 3 *Fusion du phagosome avec les lysosomes* : les vacuoles, chargées en agents chimiques (hydrolases acides), fusionnent avec le phagosome et y déversent leur contenu formant le phagolysosome. Cette étape est primordiale pour permettre une éventuelle dégradation (dissolution, cassure, etc.) de la particule (Dumortier, 2003).
- *Terminaison* :
- 4 Soit la particule à l'intérieur du phagolysosome est digérée et le contenu des débris est déversé par exocytose ou conservé dans le cytoplasme du macrophage pour que l'ensemble soit évacué (ChapII, 2.2).
  - 5 Soit la particule demeure intacte résistant à l'action des enzymes et reste dans le cytoplasme du macrophage jusqu'à sa mort. Le mécanisme reprend alors avec de nouvelles cellules qui vont réitérer le mécanisme de manière auto-entretenu.

Que deviennent alors les particules qui ne sont pas dégradées ?
---

\* Les pseudopodes : déformations de la membrane plasmique qui permettent à la cellule de ramper le long d'une surface et de se nourrir.

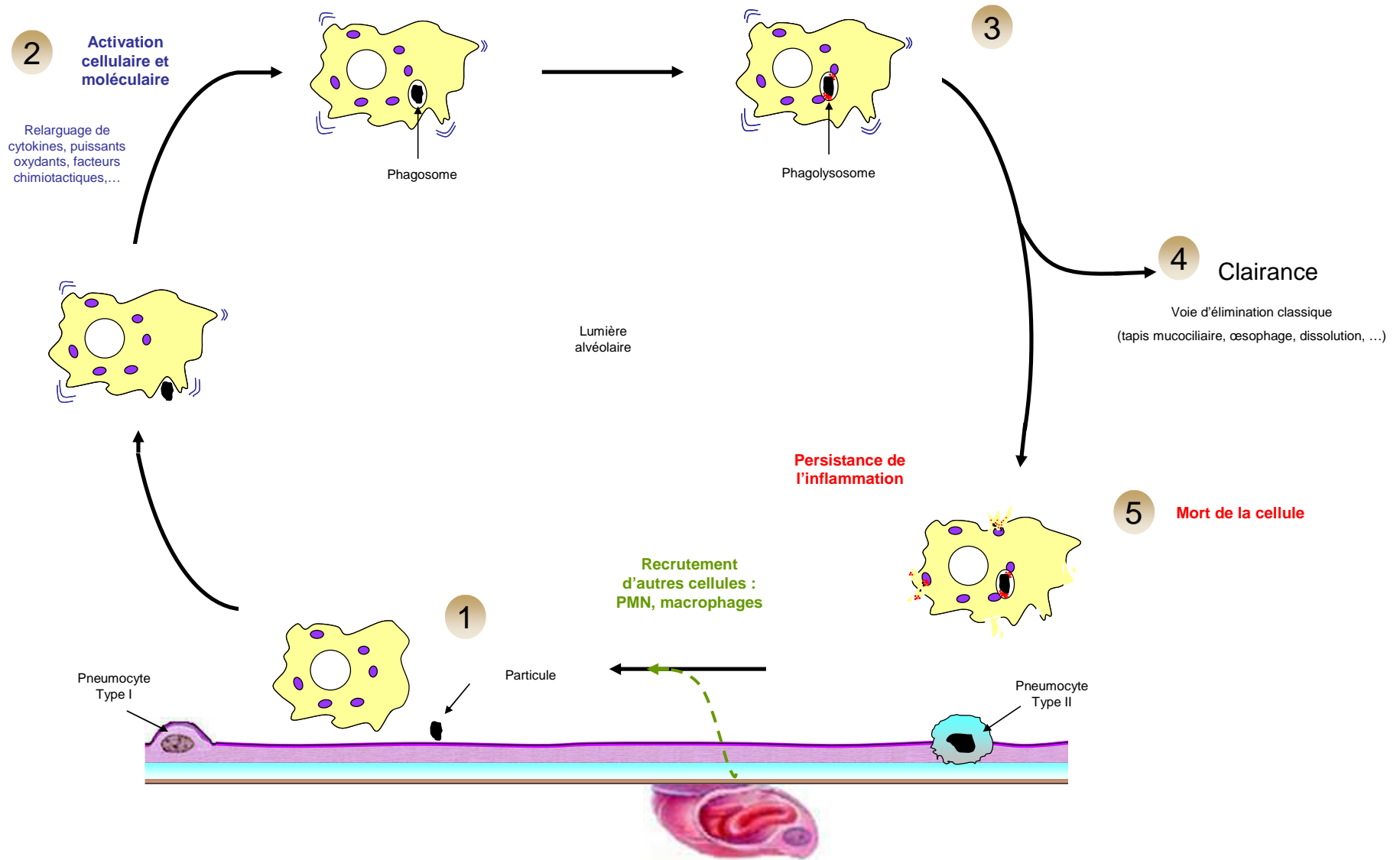


Figure 18 : Mécanisme de phagocytose - internalisation de particules minérales

## 2.2. Devenir des particules inhalées : clairance pulmonaire

La toxicité des particules inhalées dépend en partie de leur capacité à être éliminées totalement ou partiellement (processus de clairance). Soit les particules sont dissoutes dans les fluides biologiques (mucus, surfactant, etc.) avec absorption et élimination des constituants solubilisés ; soit elles sont éliminées mécaniquement (toux, éternuement). Par expulsion des mucosités nasales et trachéales vers le pharynx et la bouche, l'homme procède à l'évacuation des particules inhalées. Ce système de clairance permet ainsi l'évacuation de millions de macrophages chargés en particules depuis les bronches les plus profondes avec une vitesse qui va dépendre de l'étage pulmonaire.

### - La clairance muco-ciliaire

Ce mode de clairance concerne les zones respiratoires supérieures et trachéobronchique. Nous avons vu que les particules qui n'atteignent pas les alvéoles pulmonaires sont arrêtées et engluées dans le mucus. Le drainage muco-ciliaire permet leur évacuation vers le pharynx où elles seront dégluties ou expectorées en 48 heures (Bailey et al., 1982). De nombreux facteurs peuvent influencer ou endommager ce transport muco-ciliaire rendant ainsi le système respiratoire plus vulnérable (asthme, tabagisme, pollution atmosphérique, etc.).

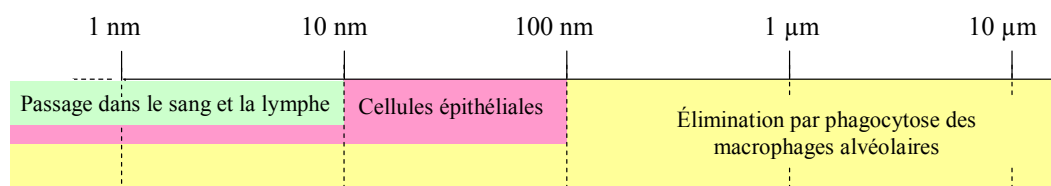
### - La clairance alvéolaire

Les particules qui atteignent les alvéoles pulmonaires sont principalement phagocytées par les macrophages alvéolaires. Ce processus rapide s'effectue en quelques heures mais demeure saturable (Oberdörster, 1997 ; Bermudez et al., 2004). La majorité des particules piégées dans le surfactant est phagocytée en 24 heures (Stuart, 1976 et 1984). Par suite, les macrophages alvéolaires chargés de particules peuvent quitter la région pulmonaire soit en remontant progressivement via le tapis muco-ciliaire, ou soit en migrant vers le système lymphatique\*. Si le macrophage meurt en restant dans la lumière de l'alvéole, il est autolysé et le matériel non digérable est libéré puis, à nouveau phagocyté par de nouvelles cellules et ainsi de suite.

---

\* La lymphe : liquide baignant les organes dont la composition est analogue à celle du plasma sanguin. Elle contient des globules blancs, notamment des lymphocytes.

Le phénomène devient plus complexe avec la diffusion des particules ultrafines vers d'autres organes par translocation\* et dont on ignore le devenir (Figure 19).



**Figure 19 : Mécanismes de clairance alvéolaire en fonction de la taille de particule d'après le modèle de Hoffman sur les particules insolubles (Hoffman et al., 2003)**

Ce phénomène de translocation reste aujourd'hui le support de nombreux travaux relatifs aux nanoparticules (Oberdörster, 2002 ; Nemmar et al., 2004 ; Geys et al., 2005) et peut expliquer que des maladies aient été observées dans d'autres compartiments (foie, rein, cerveau, cœur, plèvre).

Ainsi, la cinétique de clairance au niveau alvéolaire varie suivant le processus impliqué et la taille des particules mais reste en général comprise entre plusieurs semaines et plusieurs mois voire des années pour l'élimination de particules relativement insolubles.

L'organisme a une aptitude à éliminer les particules inhalées, même si ces mécanismes sont longs et fragiles (saturation, etc.). Les particules sont, soit entraînées avec les macrophages via le tapis muco-ciliaire, soit demeurent dans la cavité alvéolaire. Dans ce cas précis, elles participent à l'inflammation entretenue des tissus.

Les particules de SiC sont insolubles (Cichy, 1989) et vont séjourner suffisamment longtemps dans l'organisme. Il est donc important de chercher à évaluer leur activité biologique.

\* Translocation: passage des barrières physiologiques.



### 3. Activité biologique

Bien que dans les alvéoles pulmonaires la réponse immunitaire fasse intervenir différents types de cellules nous avons choisi de ne travailler qu'avec les macrophages pour évaluer l'activité biologique des particules de SiC.

La biopersistance\* des particules va être à l'origine de granulomes, clusters et corps ferrugineux retrouvés dans les tissus pulmonaires des travailleurs des usines de SiC longtemps après leur exposition (Funahashi et al., 1984 ; Hayashi et Kajita, 1988).

Outre l'élimination des particules par la phagocytose, les macrophages sont extrêmement importants dans l'orchestration de la réponse immunitaire. En effet, ils favorisent l'attraction des leucocytes sur le lieu de l'inflammation et entraînent leur activation de même que leur production dans la moelle osseuse. Pour ce faire, les macrophages sécrètent des médiateurs solubles tels que les cytokines, facteurs de croissance, espèces réactives oxygénées\* et autres médiateurs de l'inflammation, tout au cours de l'interaction avec les particules.

Bien qu'ayant des rôles différents et multiples, ces diverses molécules (cytokines, ROS), protéines et enzymes (LDH,  $\beta$ -glucuronidase, Caspase 3 and 5, etc.) vont pouvoir être caractéristiques de certains domaines de la réponse cellulaire. Sur ce principe, de nombreuses études se sont attachées à évaluer la toxicité des particules fines et nano en suivant l'état d'inflammation (Fisher et al., 2000 ; Jimenez et al., 2002, Brown et al., 2004), l'endommagement et la mort cellulaire (Allen et al., 1995 ; Bruch et al., 2004 ; Shvedova et al. 2005), la stress oxydant (Goodlick et Kane, 1986 ; Vallyathan et al., 1992 ; Kamp et al., 1992 ; Hill et al., 1995), les mutations de l'ADN (Nehls et al., 1997 ; Svensson et al., 1997 ; Cakmak et al., 2004), etc.

Il en résulte, que le suivi de certains de ces paramètres va permettre d'évaluer l'intensité de la réponse cellulaire et d'avoir ainsi une idée globale de l'activité biologique des particules.

---

\* La biopersistance : la biopersistance des particules inhalées déposées dans les voies respiratoires peut-être définie comme leur capacité à résister au cours du temps aux mécanismes d'épuration et aux modifications physiques (fragmentation) ou chimiques (dissolution) qui interviennent dans le tissu pulmonaire.

\* Espèces Réactives Oxygénées (ERO) plus communément appelé ROS pour *Reactive Oxygen Species* : terme général qui englobe les radicaux libres et les espèces oxygénées ( $H_2O_2$ , ...) produits lors du stress oxydant.

### 3.1. Etat d'inflammation : TNF- $\alpha$

L'inflammation est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. Dans le cas de l'inhalation des particules minérales de SiC, des réactions inflammatoires ont été observées se manifestant par des fièvres, irritations et douleurs pulmonaires (Funahashi et al., 1984).

Les macrophages sécrètent principalement trois cytokines dites pro-inflammatoires, l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  avec pour fonctions communes celles de provoquer la fièvre, d'induire la production de protéines (opsonines, fibrinogène) qui jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire.

Au niveau tissulaire, le TNF- $\alpha$  active l'endothélium vasculaire (capillaire sanguin) qui deviendra plus perméable et induit l'expression des adhésines endothéliales qui favoriseront l'adhérence des leucocytes et leur passage dans la cavité alvéolaire par extravasation. Il induit également l'activation d'enzymes (phospholipase A2) responsables de la production des prostaglandines et des leucotriènes qui participent aux divers effets et symptômes précédents (Aggarwal et Natarajan, 1996). Par ailleurs, le TNF- $\alpha$  permet l'activation autocrine des macrophages, en augmentant, entre autres, le stress oxydant, la cytotoxicité et la phagocytose (Aggarwal et Natarajan, 1996). De la même façon, il active les cellules épithéliales ce qui conduit à la libération de médiateurs cytotoxiques et de radicaux de l'oxygène. La persistance des effets à long terme a pour conséquence une inflammation chronique\*.

Véritable tour de contrôle de la réaction inflammatoire, le TNF- $\alpha$  est un paramètre clef de l'inflammation et a été très souvent utilisé dans les études relatives aux particules (Borm et al 1992 ; Bruch et al. 1993/2004 ; Fisher et al., 2000 ; Nadif et al., 2003) et aux nanoparticules (Shvedova et al. 2005 ; Kagan et al., 2006).

Dans le cadre de notre étude, nous étudierons la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  qui sera le paramètre de l'état d'inflammation des macrophages.

---

\* Inflammation aiguë/chronique : une inflammation aiguë a lieu dans les premiers stades de l'interaction entre l'organisme et les particules. La persistance des réactions à long terme conduit à une aggravation des risques encourus. On parle alors d'inflammation chronique.

### 3.2. Endommagement et mort cellulaire : LDH

L'endommagement et la mort des cellules est un domaine très important en toxicité et permet d'évaluer le potentiel cytotoxique\* des particules. On distingue deux types de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose (Alberts, 1995). Les cellules devenues inutiles, endommagées ou potentiellement dangereuses sont détruites par un processus de « suicide cellulaire » fortement régulé appelé « mort cellulaire programmée » ou apoptose. A contrario, la nécrose est une mort cellulaire dite « accidentelle » qui survient lors d'un dommage tissulaire avec gonflement suivi de l'éclatement de la cellule qui déverse alors son contenu cellulaire dans le tissu environnant et provoque ou contribue localement à l'inflammation.

L'indicateur le plus employé dans le cadre d'étude de toxicité de particules minérales est la lactate déshydrogénase (LDH). C'est une enzyme présente dans toutes les cellules de l'organisme.

En pratique, la présence de LDH dans le sang ou les sécrétions des liquides bronchoalvéolaires traduit une cytolysse\* voire une augmentation de la perméabilité vasculaire responsable de la genèse des oedèmes pulmonaires observés lors d'expositions aiguës à des particules (Jhonston et al., 2000). Par conséquent, le relargage de cette molécule traduit une dégradation précoce conduisant à la mort de la cellule et donc à une cytotoxicité des particules testées (Bruch et al., 2004).

Ainsi, la très grande majorité des études évaluant la cytotoxicité des particules fines (Jhonston et al., 2000 ; Cakmak et al., 2004, Bruch et al., 2004) ou ultrafines (Lin et al., 2006 ; Thevenot et al., 2008) utilise le paramètre LDH.

Pour évaluer la cytotoxicité des particules de SiC, nous choisirons la LDH comme paramètre.

---

\* Cytotoxicité : on entend par cytotoxicité la propriété d'un agent (chimique, biologique, minérale) à altérer les cellules jusqu'à les détruire.

\* Cytolyse : destruction des cellules, spontanée ou provoquée.

### 3.3. Stress oxydant : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicaux libres

Les cellules en état d'oxydo-réduction normal, ont une concentration basale en espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO•, ROO•, R•, NO•, ONOO<sup>-</sup> etc.). Souvent, on emploie le terme de radicaux libres pour désigner ces espèces même si certaines d'entre elles (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>, etc.), se comportant biologiquement comme tel, ne sont pas, chimiquement parlant, des radicaux libres.

Il existe un équilibre dans les cellules entre la formation et l'élimination de ces espèces réactives et lorsque ce dernier est rompu, il survient un « stress oxydant ». Ainsi, on entend par stress oxydant *un déséquilibre entre les systèmes de défense et de production de radicaux libres*.

Leur présence naturelle permet de protéger l'organisme contre les agents étrangers et les cellules tumorales. Cependant, en forte concentration, ces mêmes radicaux libres sont aussi à l'origine de dommages cellulaires irréversibles par réaction avec les composants cellulaires tels que les lipides (Lin et al., 2006 ; Lundborg et al., 2007), les protéines (Fenoglio et al., 2003 ; Governa et al. 2005) et l'ADN (Fubini et Hubbard, 2003 ; I. Rahman et al., 2002 ; Q. Rahman et al., 2002). L'ensemble de ces effets contribue à l'entretien de la réponse inflammatoire, au dysfonctionnement cellulaire et à la destruction des tissus. Cet équilibre implique qu'il existe des médiateurs qui vont contribuer ou inhiber le stress oxydant.

#### - Médiateurs du stress oxydant

*Les espèces réactives oxygénées (ROS)* : issues de l'oxygène, elles peuvent se former au niveau des mitochondries ou du cytosol (NADPH oxydase, xanthine oxydase). Au départ l'oxygène moléculaire est réduit de façon progressive et contrôlée en H<sub>2</sub>O par apport de 4 électrons. En revanche, sa réduction incomplète conduit, par transfert d'un électron, au radical superoxyde (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), transformé sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figure 20). Par addition de nouveaux électrons, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donne naissance au radical hydroxyle (HO•). Ce dernier, hautement réactif, peut s'attaquer à la plupart des macromolécules (hydrates de carbone, protéines, acides nucléiques, lipides, etc.), désorganisant leur structure chimique et altérant leurs fonctions biologiques (Babior et al., 1999/2000).

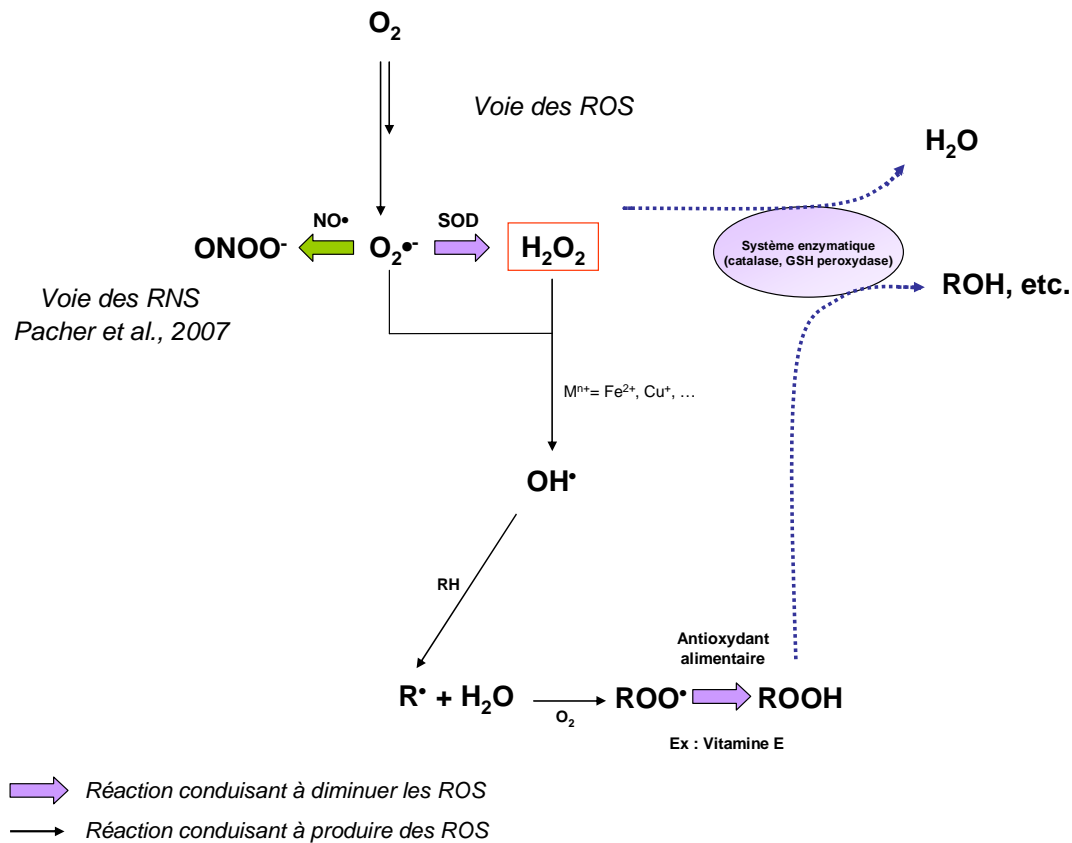


Figure 20 : Schéma récapitulatif du stress oxydant

Les espèces réactives azotées\* (RNS) : le monoxyde d'azote est une molécule qui peut être libérée par les macrophages. Il est produit sous l'action de la NO synthase (NOS), en particulier de sa forme inductible (iNOS) au cours des phénomènes inflammatoires aigus ou chroniques à partir d'arginine, d'oxygène et de NADPH (Hevel et al., 1991 ; Pacher et al., 2007). Sa production par le macrophage a pour but de contribuer à la réponse cellulaire (vasodilatation des capillaires, accroissement du débit sanguin, etc.). En présence d'un taux élevé d'ion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , le monoxyde d'azote permet la formation d'ion peroxonitrite  $ONOO^-$  (Fubini, 1998 ; Pacher et al., 2007), puissant agent oxydant et nitrant, responsable de nombreux phénomènes d'apoptose. Il existe d'autres réactions chimiques qui conduisent à la formation d'acide hypochloreux (HClO), hypobromeux (HOBr), d'oxygène singulet qui participent de la même façon au stress oxydant global mais que nous ne développerons pas dans le cadre de cette étude.

\* Espèces Réactives Azotées (ERN) plus communément appelé RNS pour *Reactive Nitrogen Species* : terme général qui englobe les radicaux libres et les espèces azotées ( $ONOO^-$ , ...) produits lors du stress oxydant.

### - Défenses antioxydantes

La défense anti-oxydante s'effectue par le biais de systèmes enzymatiques spécifiques présents dans la plupart des cellules (superoxyde dismutase, catalase et glutathione peroxydase), des enzymes de piégeage des métaux libres de transition ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) et des antioxydants d'origine alimentaire (vitamines E, C,  $\beta$ -carotène, etc.) susceptibles de piéger les radicaux libres sous une forme peu réactive (Figure 20). Ces éléments tendent pour une part à empêcher la formation et pour une autre part à réparer ou limiter les dégâts causés par les dérivés réactifs de l'oxygène (Evans et Halliwell, 2001). Ainsi, des études évaluent le stress oxydant des particules en suivant la diminution de ces médiateurs anti-oxydants dans le milieu biologique tel que le glutathion GSH (Fenoglio et al., 2003 ; Lin et al., 2006 ; Shvedova et al., 2008), la cystéine CSH (Fenoglio et al., 2003), etc.

Comment évaluer le stress oxydant ?

$\text{H}_2\text{O}_2$  est une molécule essentielle du stress oxydant et suffisamment stable pour être dosée dans le milieu biologique. En revanche le dosage des radicaux libres est plus complexe ; en effet la présence d'un électron célibataire leur confère une grande instabilité et une extrême réactivité chimique dans des processus le plus souvent non spécifiques (Fubini, 1998 ; Fubini et Hubbard, 2003). Leur étude, délicate en milieu biologique, s'est développée ces dix dernières années avec l'utilisation de méthodes de détection telle que la RPE (*Résonance Paramagnétique Electronique*) en milieu acellulaire\* (Fubini, 2007).

Dans de tels milieux riches en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et groupements R-H communs aux protéines cellulaires, il a été observé au contact de certaines particules la génération de radicaux libres très réactifs ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{R}\cdot$ ,  $\text{RCOO}\cdot$ ) qui ont pu être piégés dans des espèces paramagnétiques plus stables et dosées par cette technique (Fubini et al., 1995). A ce jour, il n'existe pas de données sur les particules de SiC, cependant cette méthode a été utilisée pour diverses particules : des fibres d'amiante (Aldieri et al., 2001 ; Gazzano et al., 2005), des particules fines de silice (Fenoglio et al. 2003 ; Governa et al. 2005), des nanotubes de carbone (Kagan et al., 2005 ; Fenoglio et al., 2006), etc. Cette méthode de dosage des radicaux libres permet de mettre en évidence la capacité des particules à participer à la génération des radicaux libres au contact d'agents constitutifs ou produits par la cellule.

---

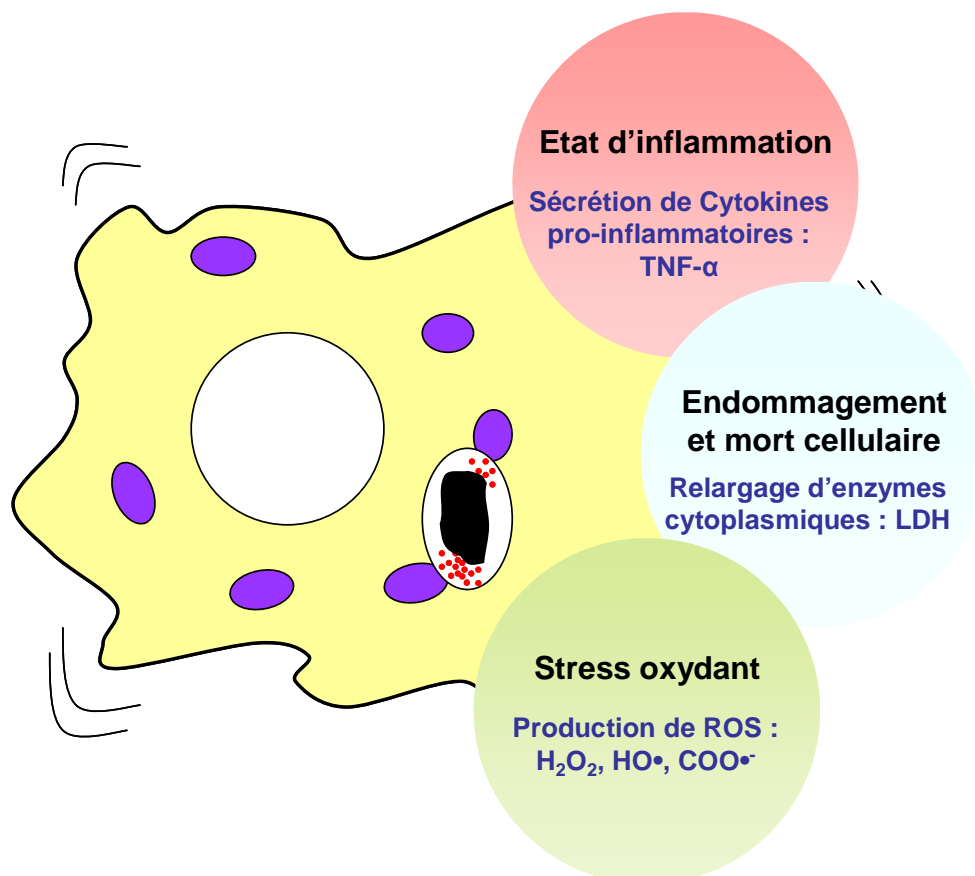
\* Milieu acellulaire : milieu artificiel sans cellule.

**Conclusion :**

Le rôle des ROS a été établi dans un grand nombre de maladies pulmonaires inflammatoires causées par l'inhalation chronique de particules (Fubini, 1998 ; Fujimura, 2000 ; Jeffery, 2001). Etudier le stress oxydant s'avère être indispensable pour évaluer la toxicité des particules.

Dans le cadre de cette étude, la contribution des particules de SiC au stress oxydant des cellules sera effectuée par suivi de la production de peroxyde d'hydrogène en milieu extracellulaire\*. En complément, sera évaluée la capacité des particules à participer à la génération de radicaux libres ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ) en milieu acellulaire.

Ainsi, nous allons étudier divers domaines de la réponse cellulaire pour avoir une idée globale de l'activité biologique des particules de SiC, à savoir l'état d'inflammation, la mort et l'endommagement cellulaire et le stress oxydant.

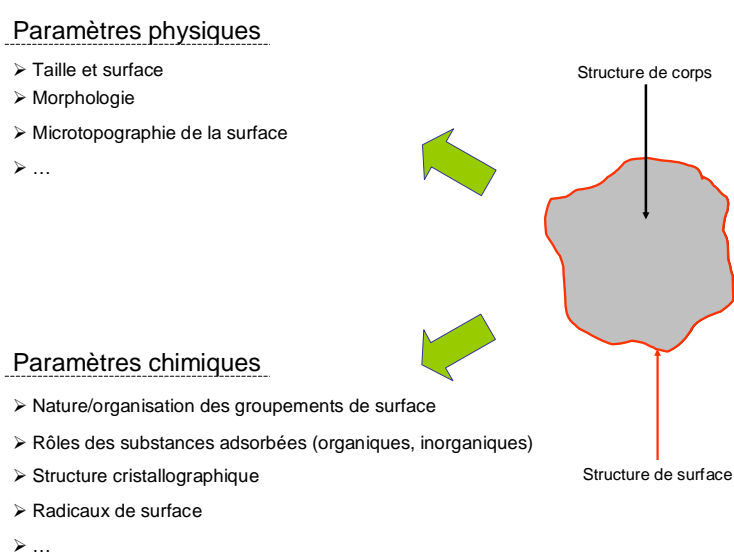


**Figure 21 : Principe du suivi de l'activité biologique de particules de SiC sur des macrophages activés**

\* Milieu extracellulaire : milieu biologique dans lequel baignent les cellules.

#### 4. Influence des paramètres physico-chimiques dans l'activité biologique

Une particule peut se schématiser par une structure de corps et une structure de surface (Figure 22) qui interviennent ensemble sur la toxicité de la particule (Lacroix, 2007). Bien que des liens entre l'inhalation de particules et les effets biologiques aient été établis, les causes exactes à l'origine des effets observés ne sont pas encore clairement définies. La masse des particules, leur taille, leur nombre, leurs propriétés de surface, leur composition chimique,... peuvent influencer la réponse biologique mais il est encore difficile de quantifier celle-ci (Lacroix, 2007). La mise en évidence des paramètres physiques et/ou chimiques qui interviennent dans l'activité biologique reste un problème extrêmement complexe (Fubini, 1997, Oberdoster et al., 2005).



**Figure 22 : Synthèse de divers paramètres physico-chimiques des particules influençant la réponse biologique**

Une longue tradition a associé le risque résultant de l'exposition aux particules à l'estimation de leur concentration massique dans l'atmosphère. Comme le souligne Hervé-Bazin (Hervé-Bazin, 2007), le problème spécifique des particules ultrafines a remis en cause le fait de raisonner uniquement en dose en interprétant certains résultats en surface et en nombre, ainsi « *s'il est justifié de parler de toxicité spécifique des particules...en raison de l'intervention parfois prédominante de paramètres physiques (surface, taille, nombre, etc.), il convient de ne pas oublier les enseignements de la toxicologie, à savoir que la nature de la substance joue toujours un rôle de première importance* ».

Dans cette partie, nous verrons les principales caractéristiques physiques et chimiques de particules de diverses natures, connues pour influencer la réponse biologique (*In Vivo* et *In Vitro*). Cette approche nous permettra de mieux cerner les paramètres qui peuvent intervenir dans la réponse biologique et d'orienter notre étude sur les particules de SiC.



## 4.1. Paramètres physiques

### 4.1.1. Masse des particules

En toxicologie, à défaut de pouvoir établir des relations avec la surface et/ou le nombre des particules, les résultats sont généralement exprimés en dose massique (Fubini, 1998 ; Oberdörster et al., 2005). Ainsi, des relations entre la dose massique et la réponse de macrophages alvéolaires (inflammation, stress oxydant) ont été observées pour des poudres microniques de silice (Bruch et al., 2004). D'autres données sur des PUF de la pollution environnementale (Saldiva et al., 2002 ; Ghio et al., 2003) ont montré des corrélations significatives entre la masse des particules et respectivement certains paramètres hématologiques étudiés (diminution du nombre de globules blancs, l'abaissement des concentrations de LDH, l'élévation du taux de fibrinogène sanguin) ou des indicateurs chimiques dans les lavages bronchoalvéolaires de rats.

### 4.1.2. Nombre de particules

Le nombre de particules peut être utilisé dans l'interprétation des résultats, en particulier si l'on étudie des particules de taille contrôlée. Dans la pratique, les particules étudiées sont polydisperses ce qui rend difficile une évaluation précise de ce paramètre. Néanmoins, des travaux ont permis de souligner l'implication de ce dernier dans la réponse biologique.

Ainsi, l'étude après instillation intratrachéale \* chez des rats, de la rétention pulmonaire de particules fines et ultra-fines de TiO<sub>2</sub>, a permis d'établir des corrélations entre les fractions de particules non récupérables par lavage pulmonaire et la dose exprimée en nombre de particules et non en masse (Ferin et al., 1992). De façon similaire, l'évaluation du rôle possible des particules fines ou ultrafines de la pollution environnementale sur les fonctions respiratoires d'un groupe de personnes a souligné des corrélations avec le nombre moyen de particules plutôt qu'avec la masse (Peters et al., 1997 ; Penttinen et al., 2001).

### 4.1.3. Surface et taille des particules

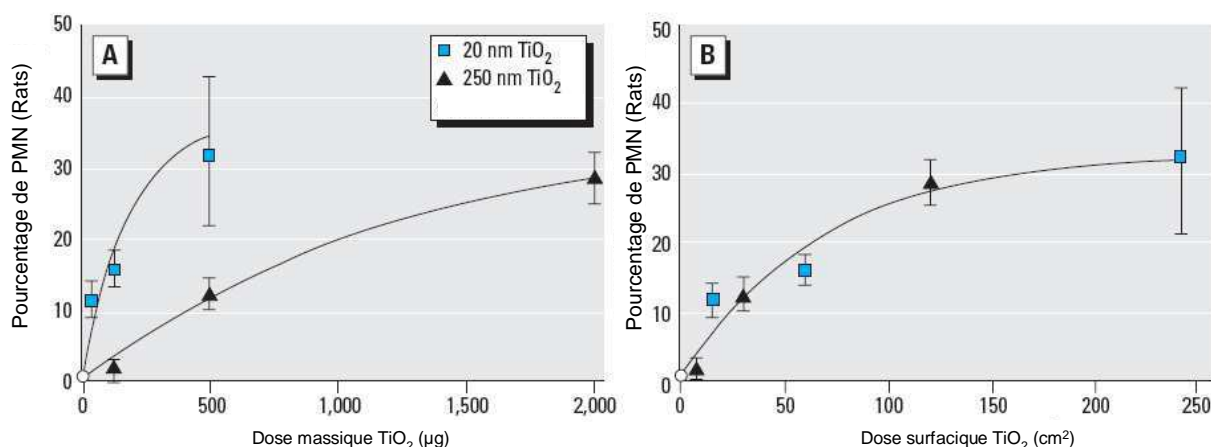
La taille est un paramètre important dans les mécanismes de transport puisqu'elle conditionne l'entrée des particules dans les voies respiratoires (Witschger, 2007). Pour des particules de même nature, plus la taille diminue et plus leur comportement diffère. Ainsi, de nombreuses différences ont été soulignées entre des nano et microparticules de même nature chimique (cf. Annexe C).

---

\* Instillation intratrachéale : méthode d'exposition qui introduit les particules directement dans les poumons par la trachée en évitant les mécanismes de protection des voies aériennes supérieures.

Dans la pratique, les résultats sont convertis de dose massique en surface. Si l'on compare des particules de même composition chimique mais de dimensions différentes, on peut s'attendre à avoir deux types de comportements (Fubini, 2007) :

- *Les effets observés sont identiques* : ces derniers sont principalement dus à l'interaction de sites actifs présents en surface des particules avec le milieu biologique qui augmentent avec la surface des particules (Lison et al., 1997 ; Oberdörster et al., 2000 ; Brown et al., 2001 ; Donaldson et al., 2002) (Figure 23).



**Figure 23 : Pourcentage de PMN recrutés dans les alvéoles pulmonaires après 24h d'inflammation déclenchée par instillation intratrachéale de particules de TiO<sub>2</sub>. La surface des particules (B) semble être le système dosimétrique le plus approprié plutôt que la masse (A) pour comparer les résultats (Oberdörster et al., 2000).**

- *les effets observés sont différents quel que soit le système de mesure considéré (massique, surfacique)* : dans ce cas, cette différence se justifie soit par la présence d'un autre paramètre pour influencer la réponse biologique tels que la morphologie, la structure cristalline (Warheit et al., 2006) soit par le changement de caractéristiques lorsque la taille des particules diminue (Lison et al., 1997 ; Fubini et al., 1999 ; Warheit et al., 2006).

Ainsi, des études très variées sur des particules de diverses natures (TiO<sub>2</sub>, BaSO<sub>4</sub>, C, particules diesels, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, etc.) ont permis de mettre en évidence des corrélations entre la taille des particules et certaines caractéristiques de la toxicité à savoir : la pénétration dans l'interstitium pulmonaire (Oberdorster et Yu, 1990 ; Oberdorster et al., 1990/1992), la translocation (Oberdorster et al., 1990 ; Ferin et al., 1991 ; Kreyling et al., 1993 ; Tran et al., 2000), la charge volumique des macrophages alvéolaires (Oberdorster et al., 1992/1994), l'altération de leurs capacités phagocytaires (Möller et al., 2002 ; Hoffmann et al., 2003 ; Renwick et al., 2004) et la réponse inflammatoire (Lison et al., 1997 ; Oberdorster et al., 2000 ; Tran et al., 2000 ; Brown et al., 2001 ; Höhr et al., 2002).

#### 4.1.4. Morphologie et microtopographie

A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de données biologiques relatives à ces caractéristiques. On peut cependant supposer que la forme de la particule et la topographie de surface peuvent intervenir dans l'activité biologique des particules.

- *La morphologie* : comme la taille, elle intervient dans les mécanismes de transport des particules dans les voies respiratoires (Witschger, 2007) et vraisemblablement dans les mécanismes de translocation (Dumortier, 2003).

- *La topographie* : la topographie de surface peut probablement jouer un rôle dans les phénomènes d'adhésion de matériels biologiques (protéines, cellules, etc.) et de réactivité de surface (radicaux libres, impuretés, etc.). En effet, si l'on calque la topologie de surface de notre particule sur le modèle théorique de l'étude des défauts (Figure 24), on peut comprendre une possible implication de l'aspect de surface dans les mécanismes biologiques.

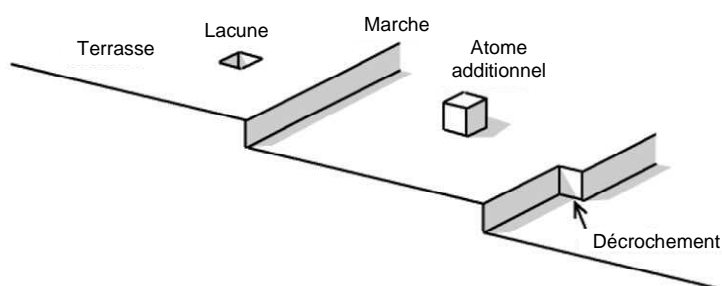


Figure 24 : Défauts de surface selon le modèle TLK\* (Hocella, 1990)

A l'échelle microscopique ou atomique, la morphologie de surface des particules pourrait à défaut d'expliquer, assurer une meilleure illustration de la réactivité de surface et des sites réactifs (Fubini, 1998 ; Hocella, 1993). Ainsi, il est connu que des surfaces rugueuses sont en général plus réactives que des surfaces « lisses » (Hocella, 1990). Par conséquent ce paramètre, comme la présence de plans de clivage ou cristallographiques différents peuvent être impliqués dans la réactivité de surface via la présence et le nombre de sites réactifs, la structure électronique, la charge de surface, etc. (Hocella, 1990 ; Eggleston et Hocella, 1992 ; Fubini, 1998).

Même si dans l'absolu ces paramètres sont intimement liés, nous nous efforcerons de présenter les résultats en dose et en surface qui nous paraissent être des systèmes judicieux et facilement accessibles.

\* Le modèle TLK (Terrace Ledge Kink) : modèle de représentation d'une surface et de ses défauts à l'échelle atomique.

## 4.2. Paramètres chimiques : réactivité de surface

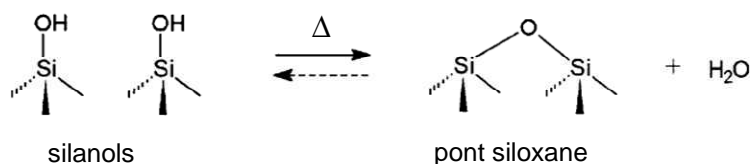
Les interactions entre cellules et particules font essentiellement intervenir la chimie de surface des particules. Longtemps ignorée, au profit des paramètres physiques, la « réactivité de surface des particules » est aujourd'hui une donnée essentielle pour interpréter la réponse biologique. Le terme réactivité de surface recouvre plusieurs caractéristiques à savoir la nature et l'organisation des groupements, la nature des espèces adsorbées et des impuretés chimiques, etc. L'ensemble de ces caractéristiques participe à l'intensité de la réponse inflammatoire (Fubini, 1997).

### 4.2.1. Nature et organisation des groupements chimiques

Certains sujets sur diverses particules ( $\text{SiO}_2$ , Polystyrène, etc.) ont permis de souligner le rôle de la fonctionnalisation de la surface des particules dans l'activité biologique (Fubini et al., 2004). Cette réactivité de surface est principalement due à la nature des groupements pouvant être présents en surface des particules (OH,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{SO}_3\text{H}$ , ion métalliques, etc.). Parmi les effets étudiés, ces groupes fonctionnels sont impliqués dans l'établissement de liaisons hydrogènes, les interactions électrostatiques, l'hydrophilie des particules, la charge positive ou négative de surface, etc.

Des études réalisées sur des poudres de silice évoquent la capacité des particules à former des liaisons hydrogènes avec le matériel biologique avec des effets directs sur le potentiel de lyse des membranes (Fubini, 1997 ; Hemenway et al., 1993) et leur cytotoxicité (Fubini et wallace, 1999). De plus, ces liaisons peuvent gouverner l'adsorption de macromolécules endogènes telles que des protéines et modifier ainsi leur conformation spatiale. Elles sont également importantes dans les phénomènes d'agglomération des particules nanométriques en milieu biologique (Legrand et al., 1998 ; Papirer et al., 2000).

Les forces électrostatiques peuvent intervenir dans la réponse biologique puisqu'elles conditionnent les interactions avec les membranes cellulaires. A titre d'exemple, les surfaces siliciques présentent des groupements silanols (Si-OH) et des ponts siloxanes (Si-O-Si). Il en résulte des interactions caractérisées par des forces de répulsions ou d'attraction entre les groupements silanols et les groupements des protéines membranaires (tétra-alkyl ammonium des phospholipides, carboxyliques de l'acide N-acétylneuraminique, etc.). Des traitements thermiques permettent de modifier la nature des surfaces en réduisant l'hydrophilie des poudres par déshydroxylation des groupements silanols en ponts siloxanes (Legrand et al., 1998 ; Papirer et al., 2000) (Figure 25).



**Figure 25 : Déshydroxylation de groupements silanols en pont siloxane (Fubini et al., 2004)**

L'utilisation de ces traitements a permis de mettre en évidence le rôle des forces électrostatiques qui influencent directement l'adsorption de protéines et l'interaction avec les membranes cellulaires (Larsericdotter et al., 2001).

Ces mêmes groupements vont conditionner le caractère hydrophile des particules. Le degré d'hydrophilie des particules reflète leur aptitude à fixer l'eau et traduit donc la capacité des particules à réagir avec le milieu biologique. Ainsi, l'hydrophilie est connue pour directement influencer l'interaction cellule/particule (Valentine et al., 1983), la distribution des particules dans les divers organes et tissus (Tobío et al., 1998), et l'adsorption de protéines (Gessner et al., 2000 ; Krishnan et al., 2006).

La charge des particules peut également influencer fortement la réponse cellulaire comme le soulignent les travaux réalisés sur des nano et microsphères de polystyrène (Ogawara et al., 2001 ; Nemmar et al., 2004 ; Harnoir et al., 2003).

#### 4.2.2. Structure cristallographique

Le rôle de la structure cristallographique a été mise en évidence en particulier pour les particules de silice cristallisées. Le quartz et la cristobalite présentent une toxicité plus importante que les silices amorphes (IARC, 1997 ; Murphy et al., 1998). La cristallinité suggère une disposition ordonnée des atomes et implique une organisation des groupements (silanols vicinaux, isolés, etc.) en surface des particules en lien direct avec la réactivité de surface (Fubini, 1997/1998 ; Fubini et al., 2004).

Par ailleurs, la structure cristallographique des particules peut participer à la formation d'espèces radicalaires. Ainsi, la quantité de radicaux libres détectée par RPE est plus importante pour des poudres de silice microniques cristallisées que pour des poudres amorphes (Fenoglio et al., 2003 ; Governa et al., 2005). Pour des nanotubes de carbone, l'effet inverse est observé puisque leur structure cristalline (et/ou leur morphologie particulière) leur confère un rôle de piègeur de radicaux (Fenoglio et al., 2006).

### 4.2.3. Impuretés : espèces adsorbées, métaux...

Diverses espèces chimiques peuvent être présentes en surface des particules. Leur provenance peut être d'origine naturelle, liée au procédé de fabrication ou résultant de l'adsorption de constituants de l'environnement. Ainsi, on peut distinguer des espèces adsorbées et des impuretés chimiques.

#### - Espèces chimiques adsorbées

Les particules peuvent transporter des substances adsorbées vers les régions des poumons où elles n'ont pas accès en théorie, induisant des effets généralement non associés au corps de la particule (Lacroix, 2007). Ainsi, diverses substances (SO<sub>2</sub>, HAP, etc.) sont connues pour s'adsorber en surface des particules et induire une toxicité accrue (Hemenway et al., 1996 ; Muzyka et al., 1998).

Certaines, extrêmement toxiques, comme les HAP ont été observées dans de nombreuses situations, en particulier dans les usines de production de SiC (Smith et al., 1984 ; Dufresne et al., 1987 ; Marcer et al., 1992) et pour les particules diesels (Muzyka et al., 1998 ; Zwirner-Baier et Neumann, 1999). Bien que connues pour leur activité mutagène et tumorigène, leurs faibles concentrations semblent empêcher ces substances d'être à l'origine de maladies pulmonaires graves. Cette idée est confirmée par l'observation de la persistance des effets cancérigènes même après nettoyage de la surface par traitements chimiques (Mauderly et al., 1994 ; Nikula et al., 1995).

Autre exemple, la présence de composés organiques comme les quinones peut permettre d'expliquer la toxicité significative de certaines PUF de noir de carbone. En effet, ces dernières, en présence de NADPH et de cytochrome P450 réductase peuvent former des radicaux superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> extrêmement néfastes pour les tissus (Kumagai, et al., 1997 ; Fubini, 2007).

#### - Espèces métalliques

Les espèces métalliques présentes en surface de particules jouent un rôle prépondérant dans la réponse biologique. En effet, les ions correspondants issus des métaux de transition peuvent participer à la production d'espèces radicalaires (Donaldson et al., 1997/2003 ; Fubini et Hubbard, 2003 ; Fubini, 2007).

Provenant la plupart du temps de l'histoire des particules (procédé de synthèse, nature des réactifs, traitements, etc.), la réactivité de ces ions métalliques va dépendre à la fois des caractéristiques morphologiques des particules mais principalement de l'état d'oxydation (Fenoglio et al., 2001 ; Shi et al., 2003 ; Borm et al., 2004) et de coordination (Pritchard et al., 1996 ; Gavett et al., 1997 ; Knaapen et al., 2002) de l'élément métallique. Parmi les espèces métalliques susceptibles d'être observées en surface des particules (plomb, cadmium, fer nickel, chrome, vanadium, etc.) un grand

nombre peut déclencher la production d'espèces activées de l'oxygène (Haliwell et Gutteridge, 1986 ; Chevion, 1988 ; Stohs et Bagchi, 1995).

Le fer en surface des particules (Figure 26) est connu pour être impliqué dans la peroxydation des lipides (Shi et al., 1994 ; Pritchard et al., 1996) et dans la production de radicaux libres tels que  $O_2\cdot^-$  et  $HO\cdot$  (Donaldson et al., 1997 ; Van Maanen, 1999 ; Prahalad et al., 2000) très souvent via la réaction de Fenton et le cycle d'Haber Weiss (Fubini et Hubbard, 2003) (cf. Annexe D). Ainsi,  $Fe^{2+}$  est connu pour avoir une réactivité trois fois plus importante que  $Fe^{3+}$  (Fenoglio et al. 2001 ; Shi et al., 2003 ; Borm et al., 2004).

Par ailleurs, les ions de faible degré de coordination sont en général très réactifs (Pritchard et al., 1996) et sont souvent ceux qui sont le plus aisément solubles en solution (Costa et al., 1997 ; Gavett et al., 1997 ; Knaapen et al., 2002). Ils peuvent alors être à l'origine d'autres effets biologiques comme l'augmentation du fer intracellulaire (Hervé-Bazin, 2007 ; Aust et al., 2002), l'état d'inflammation (Carter et al., 1997 ; Kodavanti et al., 1998 ; Y.C Huang et al., 2003) voire poursuivre sa contribution à la génération de radicaux libres (McNeilly et al., 2004).

Dans la pratique, mettre en évidence la toxicité des métaux, consiste à piéger les éléments métalliques avec de puissants chélatants (deferoxamine, ferrozine, etc.). Ces techniques ont pu souligner l'impact des ions métalliques sur l'état d'inflammation (Carter et al., 1997), la cytotoxicité (Monn et Becker, 1999) et la génération de radicaux libres (Fenoglio et al., 2003). Sur ce dernier point, la complexation du fer avec la deferoxamine sur des poudres de silice a permis de constater une diminution très significative de la toxicité des particules en évaluant la quantité de radicaux libres générée au contact des particules (Fenoglio et al., 2003 ; Governa et al., 2005).

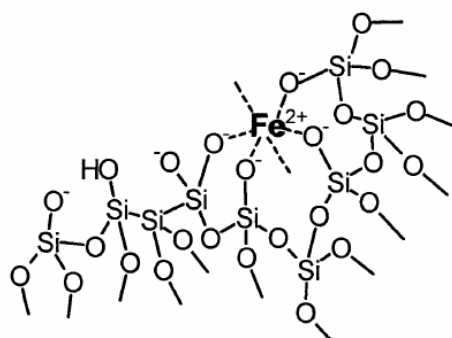


Figure 26 : Illustration de la présence d'ions fer en surface de poudre de silice (Fubini et Hubbard, 2003)

#### 4.2.4. Radicaux de surface

Des espèces radicalaires peuvent également être produites en solution par l'action de radicaux de surface propre aux particules. Ce phénomène a été mis en évidence sur des surfaces siliciques ou dans les poudres traitées mécaniquement (broyage, décapage, etc.). Ainsi, Fubini décrit l'exemple de poudres de quartz « fraîchement broyées » en comparaison avec des poudres « vieilles » (Fubini, 1998 ; Stratta et al., 2001). Sur ces surfaces « *freshly cleaved surface* » (Vallyathan et al., 1995) des radicaux libres peuvent être présents issus de la rupture homolytique\* de liaisons Si-O avec formation d'espèces telles que Si•, SiO• (Figure 27), pouvant réagir à leur tour avec des composants atmosphériques pour donner d'autres radicaux tels que SiO<sub>2</sub>•, SiO<sub>3</sub>• et des anions superoxyde (Fubini, 1998 ; Fubini et Hubbard, 2003).

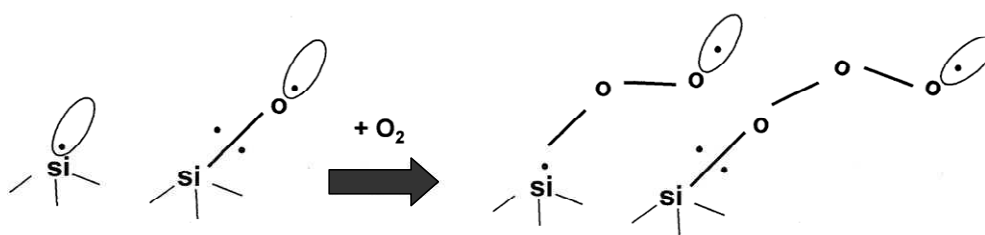


Figure 27 : Présence de radicaux libres en surface de surface silicique (Fubini et Hubbard, 2003)

La même observation est effectuée pour des particules de MnO<sub>2</sub>, qui broyées présentent une activité cytotoxique nettement plus importante que les particules initiales (Lison et al., 1997), soulignant un possible effet des défauts de structure des cristaux.

Ainsi, l'historique des poudres et en particulier la nature des traitements mécaniques contribue à l'intensité de la réponse inflammatoire (Fubini, 1997/1998).

### Conclusion

Le problème de la réactivité des particules et des paramètres physico-chimiques mis en jeu reste très complexe. Néanmoins, les nombreuses études sur les particules fines et ultrafines ont permis de mettre en évidence certains paramètres principaux (taille, surface, morphologie, impuretés, nature cristallographique, état de surface, etc.) qui serviront de trame pour orienter notre travail dans le cadre de l'activité biologique des poudres de SiC. Nous nous inspirerons, également, de certaines méthodes (traitement thermique, etc.) pour tenter de mettre en évidence l'influence de certains paramètres physico-chimiques.

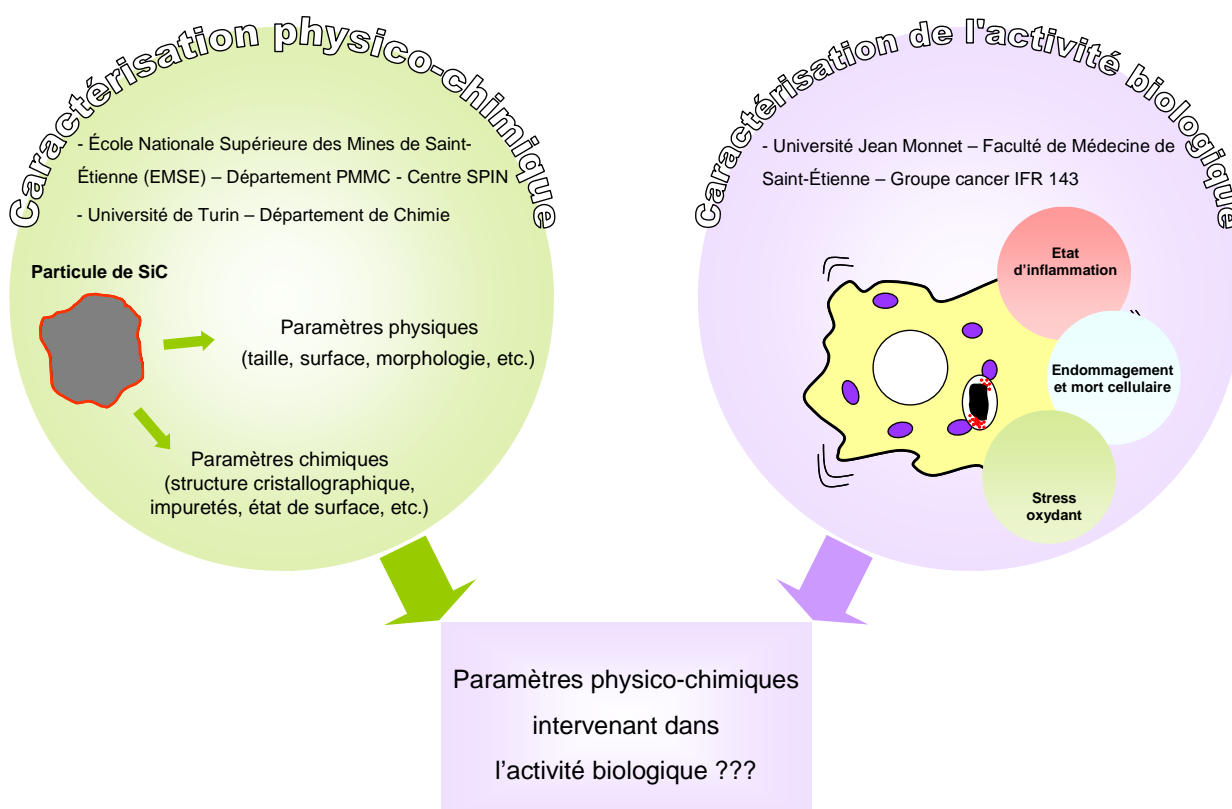
\* Rupture homolytique d'une liaison covalente : les deux électrons de la liaison covalente se partagent entre les deux atomes liés, donnant naissance à deux radicaux libres.



## Démarche expérimentale

Dans cette partie, nous nous proposons de présenter les outils qui nous permettront d'aborder le travail sur la caractérisation physico-chimique et l'évaluation de l'activité biologique des particules de SiC.

Dans le cadre de notre démarche expérimentale (Figure 28), nous allons travailler dans un premier temps avec des micros et nanoparticules de SiC que nous allons entièrement caractériser d'un point de vue physico-chimique. Ensuite, nous procéderons à l'évaluation globale de leur activité biologique par le biais de tests *In Vitro* sur des macrophages alvéolaires.



**Figure 28 : Représentation schématique du travail pour évaluer l'activité biologique de particules minérales**

Finalement, la mise en relation des résultats propres à ces deux domaines distincts nous permettra d'établir des corrélations entre certains paramètres physico-chimiques et l'intensité de la réponse cellulaire.

Expérimentalement, au regard de l'étude bibliographique, nous allons tenter de cerner les principaux paramètres physiques et chimiques des particules. Pour mettre en avant l'implication de certains paramètres de surface dans l'activité biologique de ces particules, nous allons recourir à des modifications de la surface de certaines particules (traitements thermiques, chimiques). L'ensemble de ces caractérisations sera effectué au centre SPIN – département PMMC (*Poudres et Matériaux Multi-Composants*) de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne (EMSE). La caractérisation des radicaux libres en milieu acellulaire est une technique spécifique qui se déroulera au Département de Chimie de l'Université de Turin.

Nous évaluerons nous-mêmes en parallèle l'activité biologique des particules par le biais de tests *In Vitro* sur des macrophages de lignée (RAW 264.7). L'objectif est de suivre l'évolution de divers domaines de l'activation cellulaire (état d'inflammation, mort cellulaire et stress oxydant) au contact des particules de SiC. En reliant ces différents paramètres biologiques entre eux, nous aurons une idée de la toxicité globale des particules de SiC. La mise en place de la culture cellulaire et la réalisation des mesures biologiques effectuées à la faculté de médecine de Saint-Étienne (*Groupe Cancer IFR 143*).

Cet ensemble de caractérisations constituera une base de données dont le recoupement nous permettra, à défaut de répondre de façon catégorique à la question de la toxicité des particules de SiC, d'indiquer la tendance générale de l'activité biologique et de dégager des paramètres physiques et/ou chimiques directement impliqués dans la réponse cellulaire.

## **CHAPITRE III :**

# **MATERIELS ET METHODES**

### **1. Présentation des poudres étudiées**

#### **1.1. Les poudres de SiC**

Les poudres de SiC utilisées dans cette étude sont issues de divers procédés de synthèse. Nous allons étudier des poudres industrielles micrométriques synthétisées par le procédé Acheson, des nanoparticules produites par pyrolyse laser et par voie sol-gel.

##### **1.1.1. Particules industrielles obtenues par procédé Acheson**

Cinq poudres synthétisées par le procédé Acheson dans une usine de fabrication typique de SiC sont étudiées (ChapI, 4.2.1). Notées SiC A1 à A5, ces dernières correspondent à des particules de SiC- $\alpha$ .

- Les poudres de SiC A1 et A3 sont destinées aux applications des abrasifs et des matériaux réfractaires.
- Les poudres de SiC A2 et A5 sont principalement utilisées dans la fabrication des filtres à particules (*FAP*) pour les véhicules diesels ou les céramiques techniques.
- La poudre de SiC A3 dite « métallurgique » correspond à un échantillon du cylindre récupéré loin du centre de l'électrode au cours du procédé Acheson (Figure 10) et destinée à être recyclé d'une cuisson à l'autre. Relativement impur, cet échantillon sera représentatif des poussières inhalées dans l'environnement de travail.

##### **1.1.2. Nanoparticules obtenues par pyrolyse laser**

Cinq poudres synthétisées par pyrolyse laser (Chap I, 5.2) à partir de précurseur gazeux silane ( $\text{SiH}_4$ ) et acétylène ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) sont étudiées (Leconte et al., 2007). Différents réglages du dispositif de synthèse (débit et proportion des réactifs, puissance du laser, etc.) permettent d'obtenir des poudres présentant des caractéristiques différentes

principalement la taille et la stœchiométrie (Boucle, 2004). Globalement, l'ensemble des poudres correspond à des nanoparticules sphériques de SiC- $\beta$ .

### 1.1.3. Nanoparticules obtenues par voie sol-gel

Une poudre de SiC obtenue par voie sol-gel est également étudiée. Notée SiC SG, elle est synthétisée dans l'eau à partir des précurseurs suivant : PTES (phenyl-triethoxy silane) et TEOS (triethoxy silane) (Figure 14). Après 24h à 20°C, le gel est récupéré et séché dans une étuve (60°C/48h). Finalement, un traitement thermique sous argon à 1500°C est réalisé pour assurer la réduction carbothermique de la silice par le carbone des groupements organiques (Seog et Kim, 1993). La poudre obtenue correspond à des particules nanométriques de morphologie sphérique de SiC- $\beta$ .

## 1.2. Les poudres témoins

Pour les tests *In Vitro*, nous avons besoin d'échantillons témoins à savoir :

- *un témoin positif de toxicité* : qui correspond à un échantillon connu pour sa toxicité et son caractère cancérigène. Nous avons obtenu deux échantillons de poudre de silice cristallisée sous forme de quartz. Un échantillon de quartz DQ12 (IARC, 1997 ; Fubini et al., 2004 ; Bruch et al., 2004) et un échantillon de Min-U-Sil (Berkeley) (IARC, 1997 ; Elias et al., 2000 ; Horwell et al., 2007), connus pour leur toxicité et leur réactivité de surface.

- *un témoin négatif de toxicité* : qui correspond à un échantillon connu pour son inertie biologique. Dans la pratique, les différentes équipes qui travaillent sur des thèmes de toxicité prennent de façon aléatoire des témoins négatifs qui vérifient une absence de réactivité suivant les paramètres étudiés. Ainsi, nous disposons de plusieurs échantillons qui peuvent convenir à notre étude à savoir : un échantillon de CaSO<sub>4</sub> (Poser et al., 2004 ; Dopp et al., 2005), de corindon (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, F1200) (Bruch et al., 2004) et de TiO<sub>2</sub> (Rahman et al., 2002).

Dans la pratique tous ces échantillons ont été analysés dans nos différentes évaluations biologiques. Bien qu'ils répondent tous à leur critère d'inertie biologique ou de toxicité,

nous avons fait le choix de n'utiliser et de ne présenter les résultats qu'avec le quartz DQ12 et le CaSO<sub>4</sub>.

**Conclusion :**

Dans le cadre de ce travail, nous étudierons successivement cinq poudres industrielles de SiC produites par le procédé Acheson puis six poudres nanométriques dont respectivement cinq sont synthétisées par pyrolyse laser et une par voie sol-gel. Les résultats relatifs à leur activité biologique seront présentés en utilisant un témoin négatif de toxicité (CaSO<sub>4</sub>) et un témoin positif de toxicité (quartz DQ12).

**2. Techniques analytiques**

Plusieurs techniques ont été utilisées pour la caractérisation physico-chimique des poudres afin d'obtenir des informations sur les paramètres physiques (taille, surface, morphologie) et chimiques (structure cristallographique, impureté, état de surface).

## 2.1. Granulométrie laser

La granulométrie laser est une technique de caractérisation permettant de déterminer la taille des particules. Elle est basée sur la diffraction et la diffusion d'un faisceau laser traversé par un flux de particules. Brièvement, les particules sont mises en suspension dans de l'eau qui circule en circuit fermé (Figure 29). Le signal est ensuite traité analytiquement en assimilant les particules à des sphères via la théorie de Mie. L'appareil utilisé est un granulomètre laser Malvern MasterSizer 2000  $\mu$ P (EMSE). Cette méthode permet d'obtenir la distribution de taille des particules et reste valable pour des diamètres de particules compris entre 0,02  $\mu$ m et 2000  $\mu$ m.

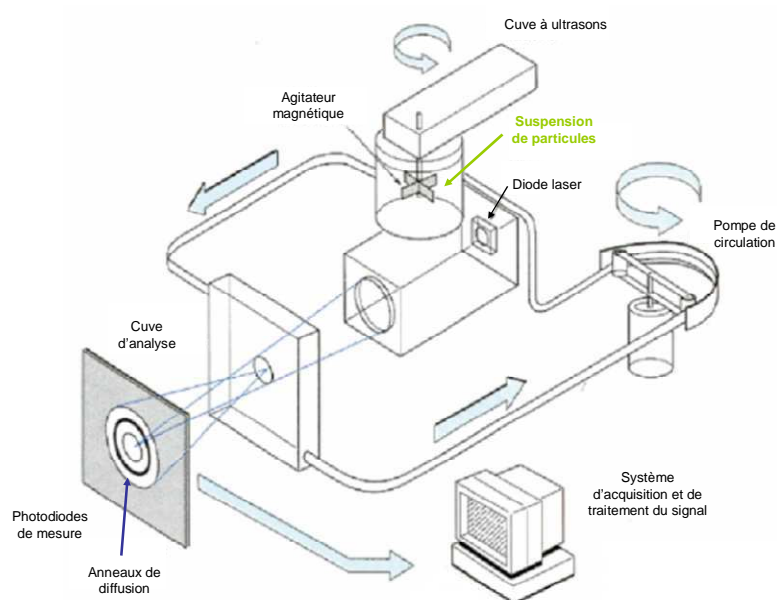


Figure 29 : Principe de mesure d'un granulomètre laser

Nous utiliserons le diamètre médian ( $D_{50}$ ) de la distribution granulométrique comme indicateur de la taille moyenne des particules.

## 2.2. Microscopie Electronique à Balayage

Les particules de SiC des divers échantillons seront observées au microscope électronique à balayage équipé d'un canon à émission de champ (MEB-FEG) afin d'avoir une résolution suffisante pour l'observation des nanoparticules. Ces observations nous permettront d'avoir des données sur la morphologie et l'aspect de surface des particules de SiC. Après une métallisation à l'or, les particules de SiC sont observées avec MEB-FEG (JEOL JSM-6500F) (EMSE).

## 2.3. Mesure de la surface spécifique

La mesure de la surface spécifique repose sur la détermination de la quantité de gaz physisorbée, à basse température, en une monocouche à la surface de l'échantillon. Le calcul de la surface spécifique est fondé sur la théorie BET (*Brunauer, Emmett et Teller*) qui repose sur le traitement analytique de l'isotherme d'adsorption déterminée expérimentalement. Il est ainsi possible de définir la quantité de gaz adsorbée en une monocouche complète (Figure 30), puis de calculer l'aire de cette couche et donc la surface spécifique des particules de SiC.

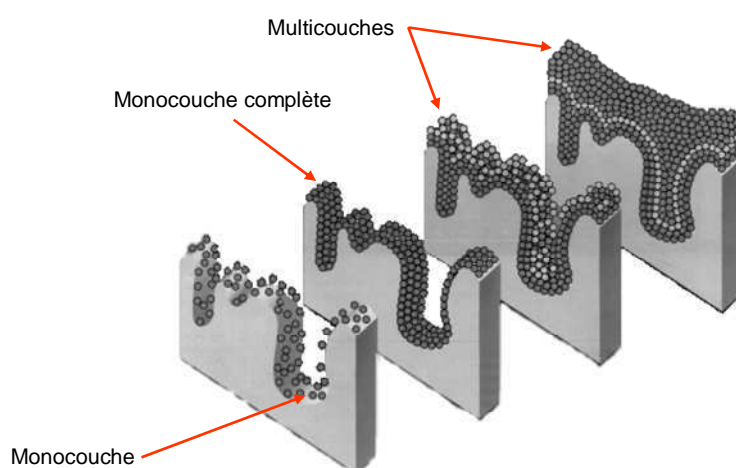


Figure 30 : Principe des différentes étapes d'adsorption d'un gaz à la surface d'un solide

L'appareil Micromeritics ASAP 2000 (Figure 31) permet la mesure de la surface spécifique des échantillons à partir de la courbe d'adsorption d'un gaz inerte ( $N_2$  ou Kr) à basse température ( $-196^\circ C$ ).

Expérimentalement, l'échantillon est introduit dans une ampoule en verre équipée d'un bouchon. Une première étape de dégazage a lieu sous vide à  $150^\circ C$  pendant environ 2 heures (dégazage primaire). L'échantillon est finalement placé dans le compartiment analyse pour l'étape d'adsorption de gaz. Celle-ci se déroule à basse température grâce au «Dewar» contenant de l'azote liquide ( $-196^\circ C$ ) dans lequel l'ampoule est progressivement immergée.

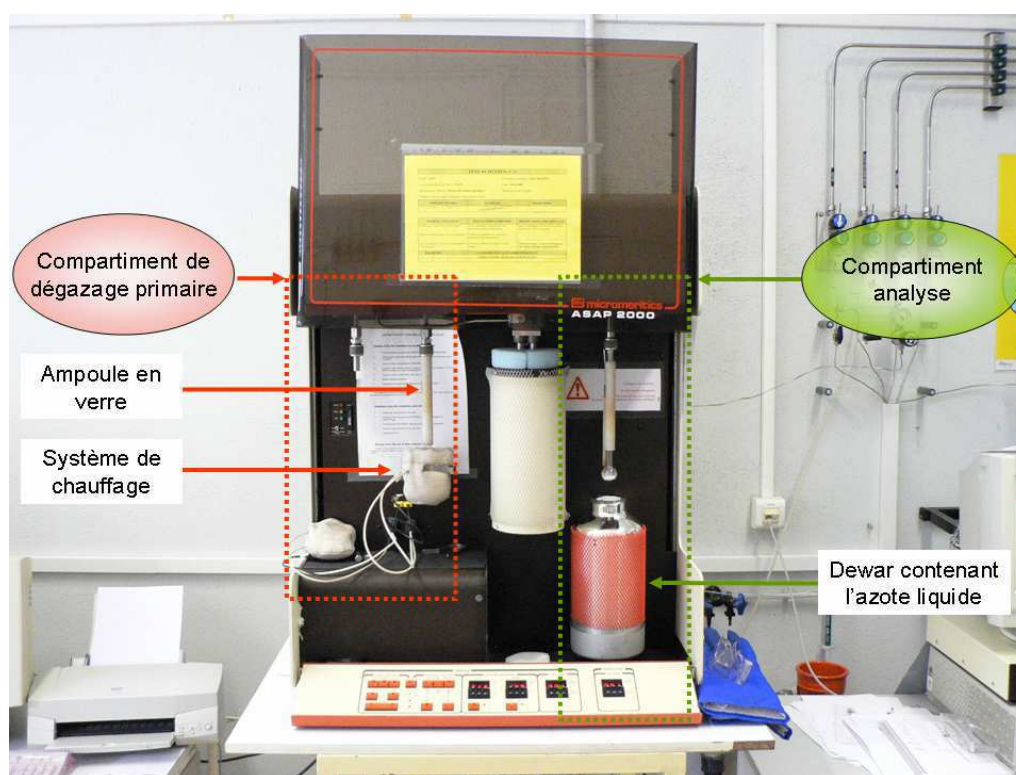


Figure 31 : Dispositif de mesure de la surface spécifique de poudres minérales (EMSE)

Le traitement analytique des données nous permet d'avoir accès à la surface spécifique des échantillons.



## 2.4. Diffractométrie des rayons X

La caractérisation par diffraction de rayons X permet de mesurer l'intensité et la position des pics afin d'identifier les phases cristallines présentes dans l'échantillon. La connaissance des positions conduit en général à la détermination des distances entre plans réticulaires associés aux réflexions en appliquant la relation de Bragg :

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

$n$  = ordre de diffraction

$\lambda$  = longueur d'onde du rayonnement diffracté

$d$  = distance interréticulaire séparant deux plans de même famille (h, k, l)

Expérimentalement, la diffractométrie des rayons X est réalisée sur un appareil Siemens Kristalloflex diffractometer D8 (Figure 32).

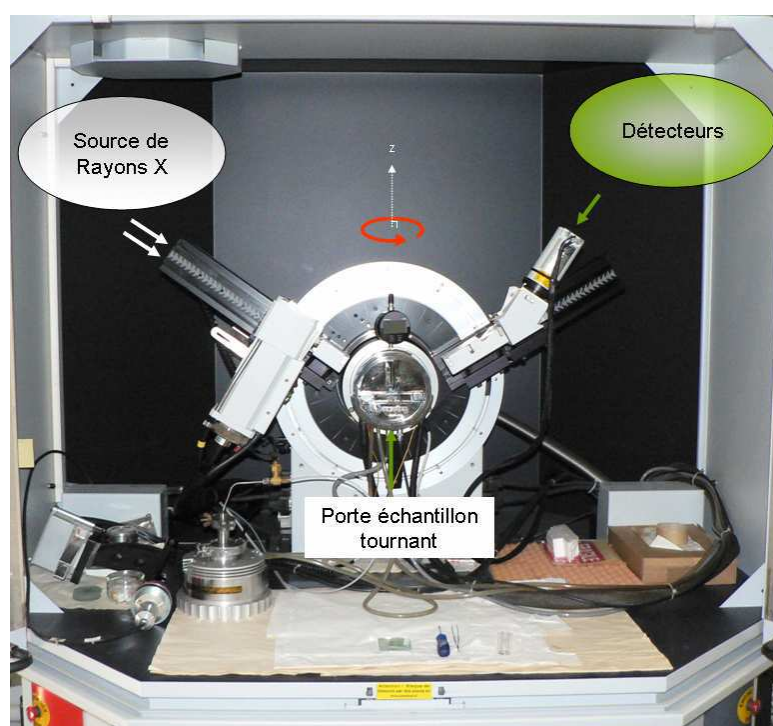


Figure 32 : Diffractomètre laser Siemens kristalloflex diffractometer D8 (EMSE)

On utilise la raie  $K\alpha_1$  du cuivre ( $\lambda = 0,15406$  nm). Le dispositif comprend une anticathode de cuivre et un détecteur ponctuel. Le porte-échantillon de ce montage

possède un mouvement de rotation motorisée qui entraîne l'échantillon autour d'un axe perpendiculaire à sa surface et qui permet principalement de s'affranchir des problèmes d'orientation préférentielle.

L'analyse se fait sur une plage  $2\theta$  allant de 10 à 80°. Le diffractogramme est ensuite analysé par la méthode de dosage semi-quantitative de Rietveld (Young, 1993). L'algorithme correspondant permet d'ajuster un diagramme de diffraction théorique au diagramme de diffraction expérimental en utilisant comme variables les caractéristiques instrumentales (fonction de résolution du diffractomètre), les paramètres structuraux (paramètres de maille, position atomique et paramètres de déplacement) et microstructuraux (taille et déformation des cristallites) de l'échantillon. L'affinement est basé sur la minimisation par la méthode des moindres carrés du résidu. Ainsi, cette technique nous permettra d'identifier et d'estimer la nature des phases cristallographiques contenues dans nos divers échantillons.

## 2.5. Analyses chimiques

- *L'ICP-AES (Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif)* : est une technique de dosage chimique qui permet la détermination de la composition chimique élémentaire d'un matériau. L'échantillon à analyser subit d'abord un traitement chimique à l'acide (HF/HNO<sub>3</sub>) permettant de le dissoudre totalement (Afnor NFX 31-147). La solution ainsi obtenue est ensuite introduite à l'aide d'une pompe péristaltique dans une chambre de vaporisation où elle est transformée en un aérosol de très fines gouttelettes. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans un plasma d'argon à très haute température ( $\approx 7000^\circ\text{C}$ ), suffisante pour ioniser complètement la plupart des éléments. Leur retour à un état stable s'accompagne d'une émission de photons dont la détection et le comptage permettent une quantification des éléments constitutifs de la poudre analysée. Ces analyses sont effectuées avec un spectroanalyseur séquentiel haute résolution Jobin-Yvon JY138 Ultrace à l'EMSE.

- *Dosage du carbone* : cette méthode consiste à mettre en œuvre la combustion des échantillons de SiC dans un four à induction sous oxygène suivi d'une analyse via un système infrarouge. Elle permet de déterminer la teneur en carbone des échantillons.

Expérimentalement, l'échantillon est introduit dans un creuset céramique (Alumine) dans lequel on ajoute un fondant (W/Fe) pour abaisser la température de fusion du matériau. L'échantillon est ainsi fondu à haute température dans le four. Les gaz de combustion sont ensuite entraînés, filtrés et traversent une série de réactifs afin de transformer le CO en CO<sub>2</sub>, pour être envoyé vers une cellule infrarouge où le CO<sub>2</sub> est détecté. Ces analyses sont effectuées avec un analyseur LECO CF 300.

- *Dosage de l'oxygène* : sur le même principe que précédemment, cette méthode est utilisée pour déterminer la teneur en oxygène de nos échantillons. Dans ce cas, la combustion de l'échantillon est effectuée sous Ar dans un creuset en graphite avec pour fondant un mélange de nickel et d'étain (Ni/Sn). Ces analyses sont effectuées avec un analyseur PC 436 DR.

- *Dosage du silicium* : la spectrométrie de fluorescence X est une méthode d'analyse chimique élémentaire qui nous permet d'estimer la quantité de silicium de nos échantillons. Expérimentalement, sous l'influence d'un faisceau incident (rayons X), les électrons du cortège électronique d'un atome peuvent être arrachés du niveau d'énergie sur lequel ils sont situés. Le niveau libre est alors susceptible d'être comblé par des électrons situés sur un niveau d'énergie supérieure. Ces transitions s'accompagnent de l'émission de photons et donnent lieu à une série de raies. Le spectre obtenu, caractéristique de la composition de l'échantillon, est analysé par analyse dispersive en longueur d'onde (*WD-XRF*).

Ces analyses relatives au dosage du carbone, de l'oxygène et du silicium sont effectuées chez un partenaire industriel.

Ainsi, l'ensemble des analyses chimiques nous permettra d'estimer respectivement, les teneurs en impuretés métalliques (Fe, Al), en oxygène, en carbone libre\* et de déterminer la stœchiométrie de nos échantillons à travers le rapport C/Si, égal à 1 pour des échantillons stœchiométriques.

---

\* Carbone libre : carbone présent dans les poudres de SiC non constitutif de la structure du SiC.

## 2.6. Analyse de surface : XPS

La spectroscopie XPS (*spectroscopie de photoélectrons*) est une technique d'analyse de surface (<10 nm) applicable à tous les solides. C'est une méthode non destructive, semi-quantitative qui permet de caractériser l'état de surface des particules de SiC.

### ➤ Principe

La surface d'un échantillon est irradiée par un faisceau de photons X, d'énergie  $h\nu$ . Les niveaux de cœur d'énergie inférieure à l'énergie des rayons X peuvent être excités et émettre un électron par effet photoélectrique avec une certaine énergie cinétique.

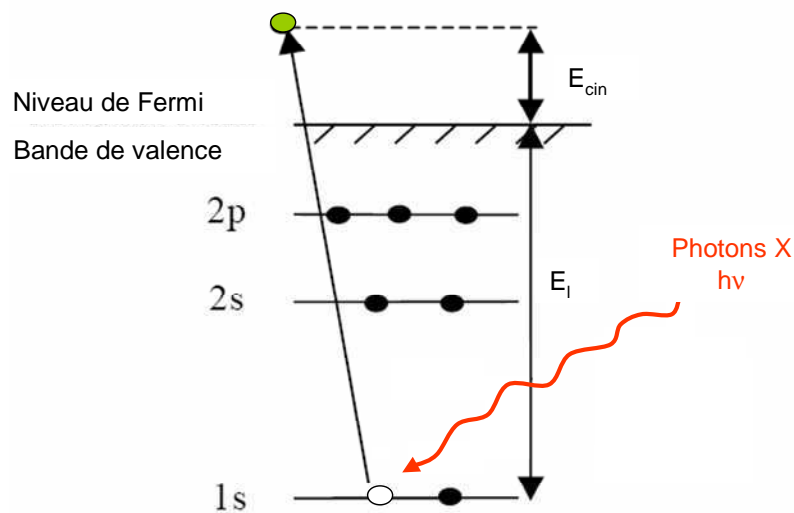


Figure 33 : Principe de la photoémission (Ekoue, 2002)

La mesure de cette énergie cinétique nous renseigne sur l'énergie de liaison des principaux niveaux électroniques des éléments chimiques.

$$E_l = h\nu - E'_{cin} - \phi_{spectro}$$

$E_l$  = énergie de liaison de l'électron du niveau de cœur d'un élément donné

$h\nu$  = énergie des photons X

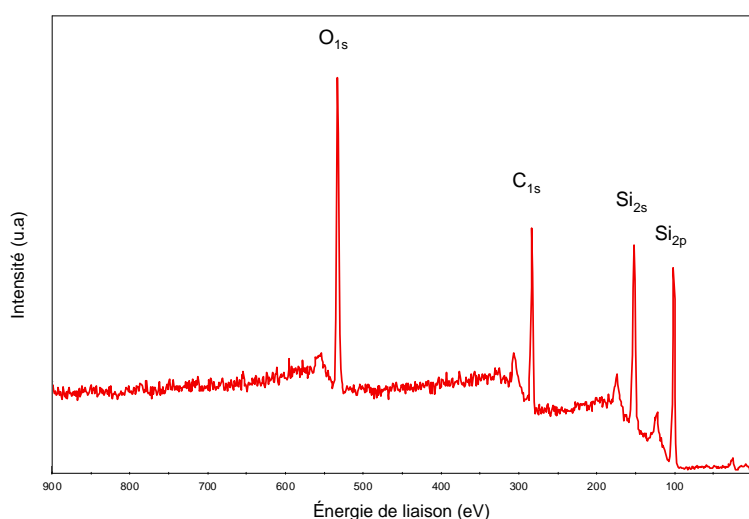
$E'_{cin}$  = énergie cinétique de l'électron entrant dans le détecteur réellement mesurée

$\phi_{spectro}$  = travail d'entrée du spectromètre au photoélectron (égal à 4eV pour notre analyseur)

L'analyse XPS permet de connaître avec précision les niveaux d'énergie pour tous les éléments de la surface analysée. Les énergies de liaison sont spécifiques à chaque élément chimique et sont sensibles à l'environnement chimique c'est-à-dire aux liaisons que réalise l'élément avec ses voisins.

➤ *Spectre XPS*

Les spectres de photoémission représentent le nombre de photoélectrons détectés en fonction de leur énergie de liaison. Ces spectres ont différentes contributions : les pics de photoélectrons, satellites, Auger, de perte d'énergie et du fond continu (Darnon, 2007). Pour notre part, nous nous intéresserons aux pics de photoélectrons qui se présentent comme une succession de pics centrés sur l'énergie correspondant au niveau électronique de l'atome photo-ionisé (Figure 34).



**Figure 34 : Allure générale du spectre XPS d'une poudre de SiC**

Pour les poudres de SiC, on distingue les pics relatifs au silicium (Si<sub>2s</sub>, Si<sub>2p</sub>), au carbone (C<sub>1s</sub>) et à l'oxygène (O<sub>1s</sub>) dont la valeur des énergies de liaisons est répertoriée dans la littérature (Wagner et al., 1979).

Dans la pratique, l'écoulement des charges en surface de certains échantillons peut créer un potentiel de surface qui ralentit les photoélectrons et décale les énergies de liaison apparentes vers des valeurs plus élevées. En pratique, on corrige ce déplacement en positionnant un pic de référence à une valeur connue.

➤ *Exploitation des spectres*

L'exploitation des spectres se déroule en plusieurs étapes :

- *La détermination de la ligne de base* : les signaux XPS caractéristiques présentent un fond spectral important (photoélectrons freinés dans la couche analysée par chocs inélastiques avant de sortir de l'échantillon) qu'il faut retrancher pour avoir une estimation la plus précise possible de l'aire du pic photoélectrique à calculer. Pour définir la ligne de base, la méthode la plus couramment utilisée, et que nous utiliserons, est la méthode de Shirley (Shirley, 1972).

- *La décomposition spectrale* : elle consiste à déterminer dans une enveloppe spectrale complexe la répartition des signaux élémentaires représentant les photoélectrons caractéristiques d'une orbitale, d'un atome et d'un environnement chimique donné. Cette décomposition nécessite de choisir un nombre défini de composantes pour lesquelles les paramètres suivants seront estimés : la position en énergie de liaison, la hauteur du pic, la largeur à mi-hauteur et la forme du pic (gaussienne, lorentzienne ou combinée). L'aire de chaque pic est déterminée en utilisant la convolution d'une lorentzienne (largeur naturelle de la raie) et d'une gaussienne (tenant compte de l'élargissement instrumental). Une régression numérique permet d'ajuster certains paramètres comme l'énergie centrale, l'intensité et la largeur à mi-hauteur de chaque pic.

- *La quantification* : une fois le traitement des spectres réalisé, la proportion atomique d'un élément A parmi un ensemble d'éléments chimiques est donnée par la relation suivante :

$$[A] = \frac{\frac{I_A}{S_A}}{\sum_k \frac{I_k}{S_k}}$$

où  $I_k$  et  $S_k$  correspondent respectivement à l'intensité et au facteur de Scofield (qui dépend de la section d'ionisation, de la fonction de transfert et du libre parcours moyen des électrons) correspondant à un élément  $k$ . La somme des concentrations de tous les éléments est égale à 100 %. La précision des mesures est de l'ordre de 20 %.

➤ *Dispositif expérimental*

Dans le cadre de nos analyses sur les particules de SiC, nous avons travaillé avec un spectromètre Thermo VG Thetaprobe (Figure 35) au centre des Sciences des Matériaux et des Structures (SMS). Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une source X AlK $\alpha$  monochromatique focalisée afin d'obtenir une zone d'analyse de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre, à une pression de résiduelle de  $10^{-10}$  Torr. Les spectres ont été acquis grâce à un analyseur hémisphérique en mode d'analyse à énergie constante avec une énergie de passage ( $E_p$ ) de 300 eV pour les spectres larges et de 50 eV pour les fenêtres énergétiques effectuées sur les pics Si $_{2p}$ , Si $_{2s}$ , C $_{1s}$  et O $_{1s}$ . La résolution énergétique mesurée sur un échantillon d'argent pur correspond à une largeur à mi-hauteur de Ag $^{3d_{5/2}}$  de 1ev pour  $E_p = 300$  eV et 0,55 eV pour  $E_p = 50$  eV. La quantification, compte tenu des approximations effectuées (libre parcours moyen, fonction de transmission, répartition homogène des éléments sur la profondeur d'analyse) est donnée avec une précision de l'ordre de 20%.

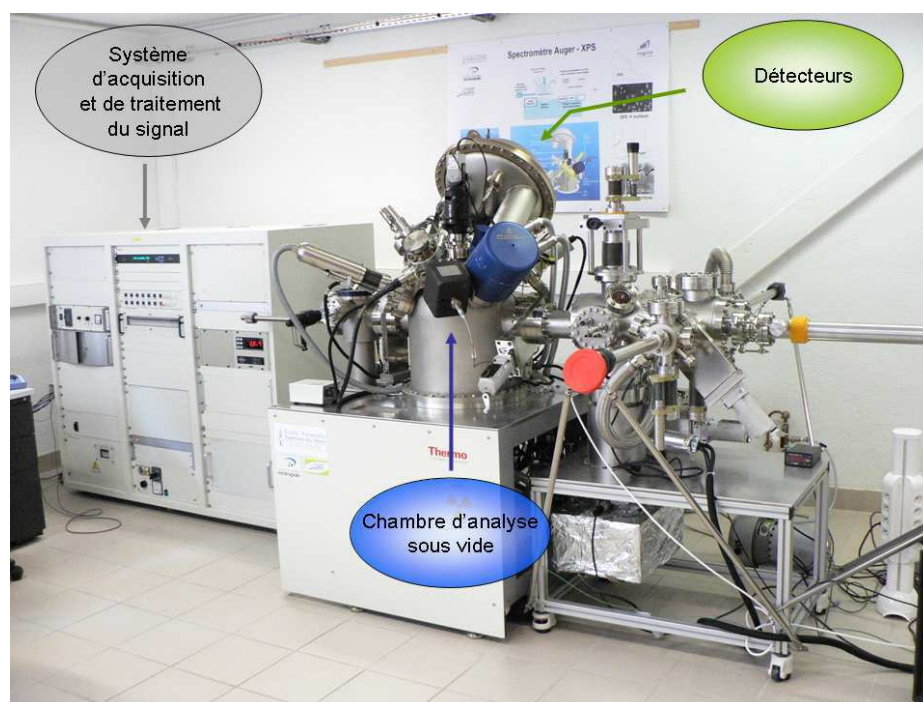


Figure 35 : Image du dispositif expérimental dédié à la caractérisation de surface par XPS (EMSE)

Ainsi, l'XPS permet d'avoir accès à l'identification qualitative et quantitative des éléments de surface et de l'environnement chimique de chaque élément.

## 2.7. Génération des radicaux libres

Cette approche permet de mettre en évidence la capacité des particules de SiC à participer à la génération de radicaux libres ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot$ ). Ces derniers ont une durée de vie très courte. Afin de les doser, il convient de les piéger (*spin-trapping*) dans des espèces paramagnétiques plus stables que l'on quantifie ensuite par RPE (*Résonance Paramagnétique Electronique*). Cette technique permet d'observer l'absorption d'énergie par un système (ici, des électrons) immergé dans un champ magnétique homogène. En effet, l'électron possède un spin et un moment magnétique. En présence d'un champ magnétique extérieur, les deux orientations permises du spin ( $\alpha$  et  $\beta$ ) déterminent deux niveaux d'énergie (Figure 36).

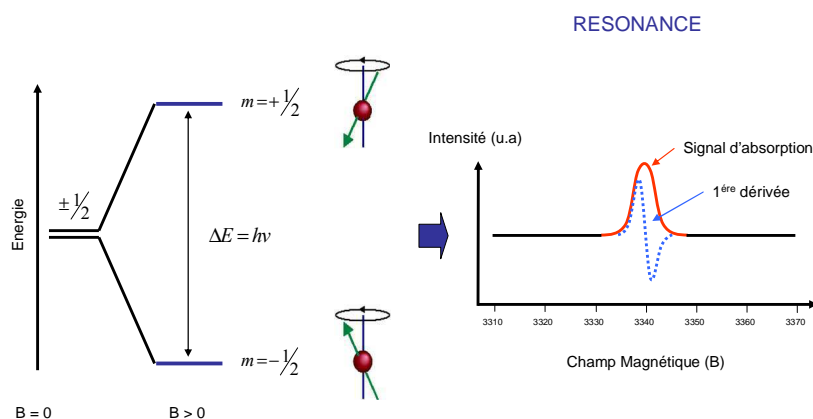


Figure 36 : Principe de la mesure en RPE

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

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

$h$  = constante de Planck

$\nu$  = fréquence du champ micro-onde

$g$  = facteur de Landé

$\beta$  = magnéton de Bohr

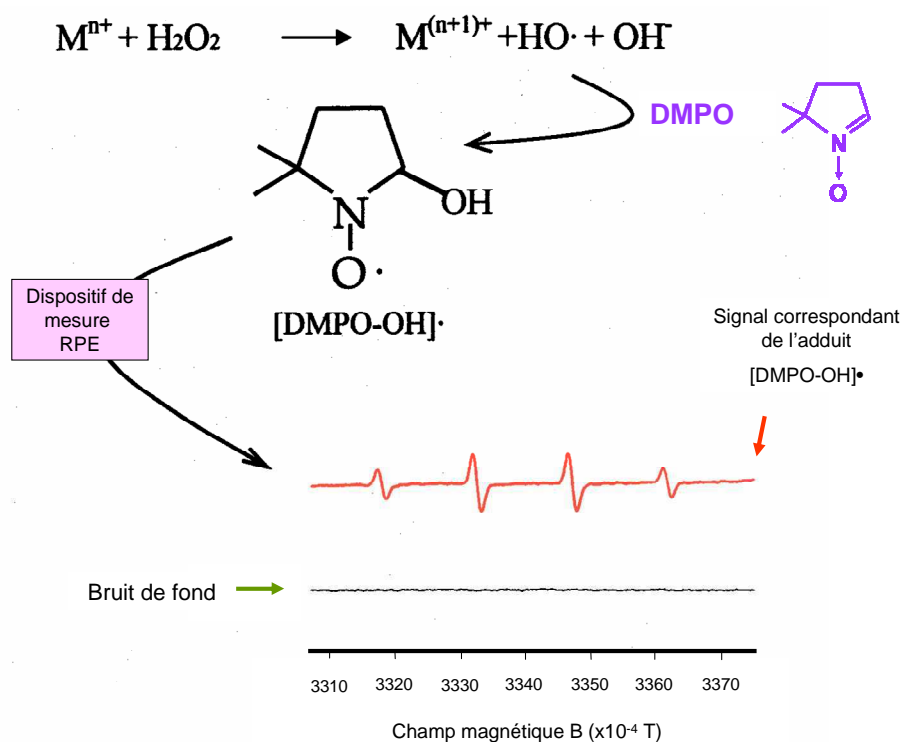
$B_0$  = valeur du champ magnétique à la résonance



Le spectre d'absorption obtenu (forme, position, intensité, etc.) est caractéristique de l'élément dosé. Ainsi, les signaux obtenus pour les composés étudiés sont parfaitement connus (Fenoglio et al., 2003/2006 ; Governa et al., 2005). L'intensité des raies est proportionnelle à la quantité de radicaux libres générée. La quantification est possible grâce à l'utilisation d'un étalon de référence (Manganèse) de concentration connue ( $5,3 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{mol}$ ) et mesurée dans les mêmes conditions expérimentales.

Nous allons procéder indépendamment à deux dosages de radicaux libres par piégeages en milieu acellulaire (Fubini et al., 1995). Nous cherchons à mettre en évidence la capacité des poudres de SiC à réagir respectivement avec :

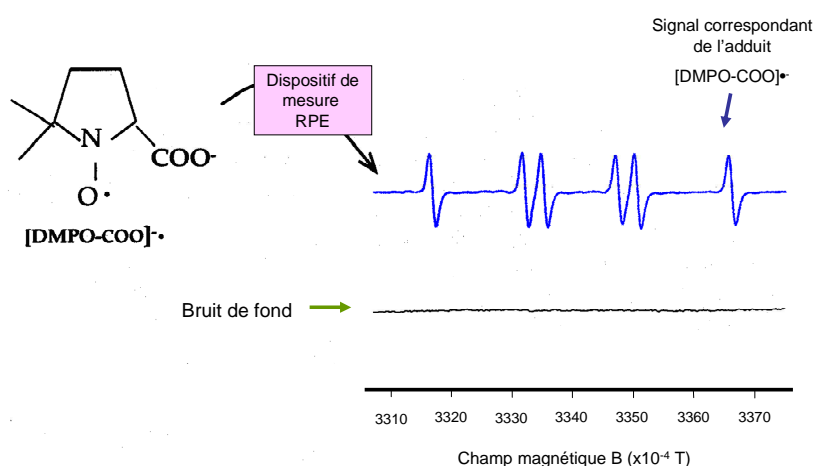
- $\text{H}_2\text{O}_2$  pour former des radicaux  $\text{HO}\cdot$  (Figure 37).



**Figure 37 : Principe de génération de radicaux  $\text{HO}\cdot$  via des réactions impliquant des espèces métalliques (activité de Fenton) avec piégeage dans du DMPO. Observation du signal correspondant à l'adduit\*  $[\text{DMPO-OH}]\cdot$**

\* Adduit : terme utilisé pour qualifier le radical persistant formé (ici  $[\text{DMPO-OH}]\cdot$ ) à partir de la réaction entre un radical transitoire (ici  $\text{HO}\cdot$ ) et un réactif diamagnétique (ici DMPO).

- des groupements C-H (communs à de nombreuses molécules présentes dans le milieu biologique) pour entraîner la formation du radical correspondant. Nous utiliserons pour cela le formiate de sodium ( $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ) comme agent cible, conduisant après rupture de la liaison C-H, à la formation du radical  $\text{COO}\cdot^-$  (Figure 38).



**Figure 38 : Principe de génération de radicaux  $\text{COO}\cdot^-$  avec piégeage dans du DMPO. Observation du signal correspondant à l'adduit  $[\text{DMPO-COO}]\cdot$**

Expérimentalement dans les deux cas, une quantité connue de poudre a été mise en suspension dans une solution tampon (0,5 M de phosphate de potassium tampon, pH 7,4) avec 0,15 M de DMPO (5-5'-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide). La réaction démarre à l'ajout de la molécule cible respectivement le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou le formiate de sodium ( $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ). La quantité de radicaux est progressivement mesurée dans des aliquots de 50  $\mu\text{l}$  prélevé dans la suspension pendant 60 minutes. Finalement, la présence d'espèces radicalaires ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ) dans la suspension est enregistrée par spectroscopie RPE (Miniscope 100 EPR spectromètre, Magnettech). L'ensemble de ces méthodes est effectué au département de chimie de l'Université de Turin.

Ces méthodes nous permettront d'estimer la capacité propre des particules de SiC à générer des radicaux libres, et donc, par transposition au milieu biologique, à participer à la dégradation des tissus.

### 3. Modification des poudres : traitement thermique oxydant

Pour tenter de mettre en évidence des paramètres physico-chimiques intervenant dans l'activité biologique de poudres de SiC, des traitements thermiques oxydants sont effectués sur certaines poudres. L'ensemble de ces traitements a pour objectif de mettre en évidence l'implication de certains paramètres de surface des particules dans l'activité biologique, en créant des modifications de la surface.

Sur la base des résultats obtenus, certaines poudres seront spécifiquement choisies pour subir des traitements thermiques et/ou chimiques.

#### ➤ *Traitement thermique oxydant*

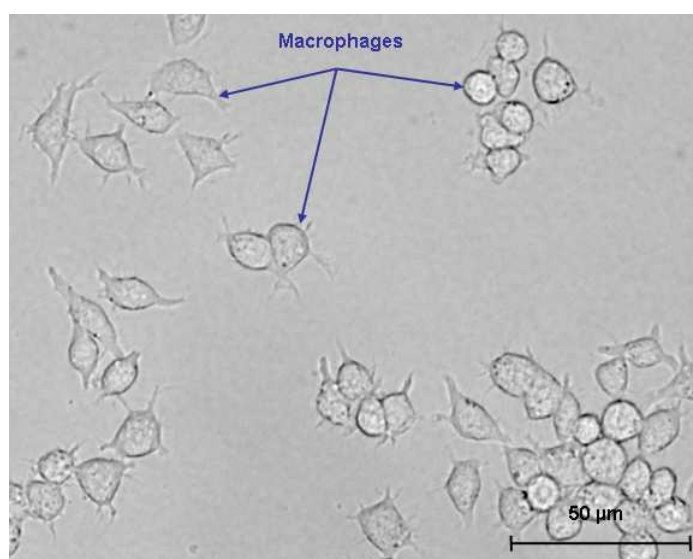
Les traitements thermiques oxydants sont effectués sur les particules industrielles de SiC A1 et A2. Brièvement, une monocouche de grain de SiC est déposée dans un creuset en alumine (AluSIK-99 ZA) au centre d'un four tubulaire (Nabertherm RHT08/17). Des traitements thermiques sous air reconstitué (78% N<sub>2</sub> / 22% O<sub>2</sub>) de 2 heures respectivement à 650°C, 750°C, 850°C et 1400°C, sont ainsi réalisés.

## 4. Mise en place de la culture cellulaire

Nous avons mis en place l'ensemble de la méthodologie relative à la culture cellulaire et à la caractérisation de l'activité biologique à la faculté de médecine de Saint-Étienne au sein de l'équipe Groupe Cancer-IFR 143. Toutes les manipulations avec les cellules sont effectuées en environnement stérile, sous hotte à flux laminaire.

### 4.1. Lignée de macrophages alvéolaires (MA) : RAW 264.7

Les cellules étudiées sont issues de la lignée RAW 264.7 (*ATCC : American Type Culture Collection*) provenant de macrophages alvéolaires (MA) de souris transformés par une souche virale de leucémie murine Ab-MLV (Abelson Murine Leukemia Virus). Ces cellules (Figure 39) ont un taux de prolifération important et permettent de disposer de suffisamment de matériel cellulaire pour les différentes expériences.

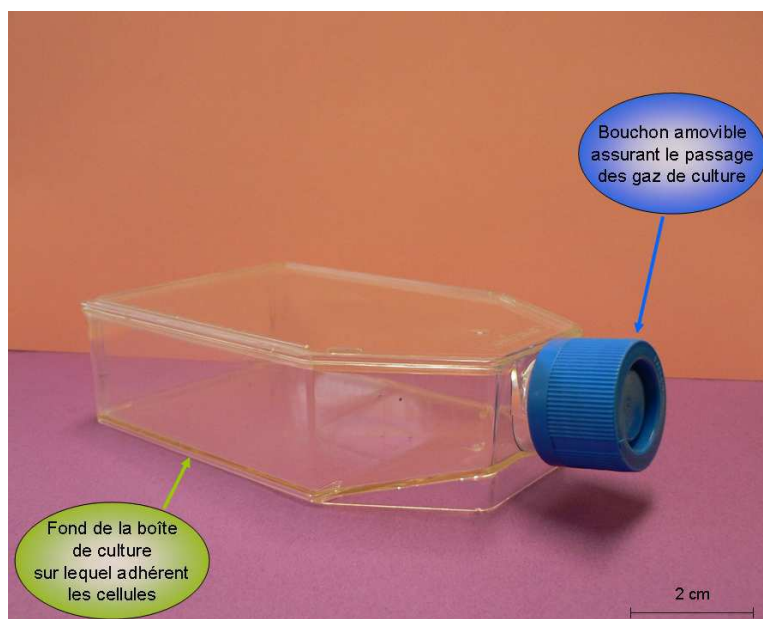


**Figure 39 : Aspect des macrophages (RAW 264.7) observés au microscope optique en contraste de phase (x400)**

Ces macrophages sont souvent utilisés dans des études relatives à l'évaluation de la toxicité de particules micrométriques (S.L Huang et al., 2003 ; Choi et al., 2008) et nanométriques (Shvedova et al., 2005 ; Kagan et al., 2006).

## 4.2. Culture cellulaire

Les macrophages sont cultivés dans un milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Gibco) supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau (Gibco), 1 ml de pénicilline-streptomycine (pénicilline à 10 000 unités/ml, streptomycine à 10 mg/ml ; Sigma). Les cellules ont été incubées à l'étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (Figure 40) contenant 25 ml de milieu de culture complet.



**Figure 40 : Image d'une boîte de culture cellulaire dans laquelle les macrophages sont mis en culture**

Ces cellules sont adhérentes et « s'accrochent » au fond des boîtes de culture. Lorsqu'elles atteignent la confluence\*, elles sont décollées du support, à l'aide d'un grattoir en plastique stérile, à raison de 2 fois par semaine. Le milieu est alors renouvelé et les cellules sont remises en culture à une concentration de  $2 \cdot 10^6$  MA/boîte. Lorsque le nombre de passage\* devient significatif (> 10), un nouvel aliquot est décongelé afin

---

\* Confluence : les cellules se développent dans la boîte de culture par division. De fait, elles remplissent la boîte après environ 2 jours de cultures jusqu'à confluence qui correspond à un recouvrement d'environ 80% du fond de la boîte de culture.

\* Notion de passage : elle correspond à un cycle complet entre deux grattages successifs des cellules dans leurs boîtes de culture.

d'éviter une dérive phénotypique\* de la lignée. On dispose de plusieurs aliquots de stockage dans de l'azote liquide (-196°C), assurant la conservation des cellules.

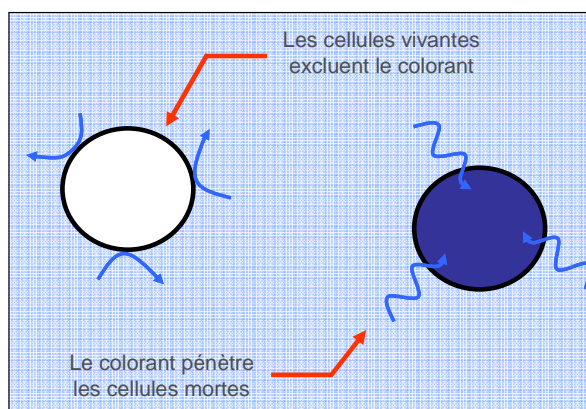
### 4.3. Préparation des cellules et des particules

#### 4.3.1. Préparation des cellules

Les cellules sont décollées mécaniquement du fond des boîtes de culture afin d'être comptabilisées (viabilité, nombre) et « rincées » en vue des évaluations *In Vitro*.

##### ➤ *Evaluation de la viabilité cellulaire*

Le test de viabilité permet d'estimer la proportion de cellules vivantes. Il repose sur les différences de perméabilité membranaire entre les cellules mortes et les cellules vivantes (Figure 41). Le colorant utilisé (bleu Trypan) a tendance à pénétrer dans les cellules. Une fois dans la cellule, il entraîne un mécanisme d'exclusion qui va le relarguer dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules vivantes peuvent le mettre en place.



**Figure 41 : Principe de l'évaluation de la viabilité cellulaire par coloration au bleu Trypan**

\* Dérive phénotypique : changement de traits observables caractéristiques des cellules (formes et allure de la membrane, aspect du cytoplasme, etc.).

Expérimentalement, la suspension cellulaire obtenue après décollement mécanique est diluée au 1/5<sup>ème</sup> dans du bleu Trypan. Le comptage en cellule de Thoma\* permet de comptabiliser les cellules blanches et bleues et ainsi estimer la viabilité cellulaire.

$$Viabilité = \frac{\text{nombre de cellules claires}}{\text{nombre de cellules bleues}} \times 100$$

Nous avons ainsi accès à la numération des cellules et l'estimation du pourcentage de viabilité (> 90% en général).

#### ➤ Rinçage des cellules

Après numération et estimation de la viabilité, les cellules sont « rincées » au PBS\* et centrifugées (10 min, 1500 tr/min, Sigma 3K12), avant d'être remises dans le milieu adéquat pour le dosage. Finalement, les cellules sont réparties au fond des puits d'une plaque multipuits (Figure 42) selon la densité choisie.



**Figure 42 : Image d'une plaque 96 puits**

\* Cellule de Thoma : lame de verre dans laquelle est creusé un quadrillage constituant une chambre de comptage. Il suffit d'y déposer la suspension de cellules pour en faire la numération au microscope optique.

\* PBS (*Phosphate Buffered Saline*) - solution tampon saline de phosphate contenant des sels (NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) servant principalement au rinçage des cellules pour enlever toute trace de milieu avant leur utilisation dans les tests *In Vitro*.

On dispose alors du matériel biologique nécessaire à la réalisation des évaluations *In Vitro*.

#### 4.3.2. Préparation des particules

Les particules sont préparées dans le milieu de culture des cellules environ 30 minutes avant les mises en contact. Dans la pratique, on prépare une suspension particulière de concentration massique connue dans un tube. Par suite, les suspensions sont préparées aux concentrations désirées par dilutions successives. Après avoir préalablement disposé les cellules au fond de chaque puits, les suspensions particulières sont fortement agitées (vortex) et un volume précis est administré aux cellules directement dans les puits de culture.

L'ensemble des particules de travail a été ainsi préparé et administré aux cellules avec les échantillons positifs et négatifs de toxicité. Des doses de particules de 15, 30, 60 et 120  $\mu\text{g}$  pour  $10^6$  macrophages alvéolaires ont été utilisées (Bruch et al., 2004).

#### Conclusion

La mise en place de la culture cellulaire de macrophages de lignée, nous permet de disposer d'un support cellulaire pratique (nombre de macrophages important, viabilité élevée, etc.). Après avoir préalablement préparé les cellules et les suspensions particulières, nous pouvons finalement mettre en place la méthodologie d'évaluation de l'activité biologique des particules de SiC.



#### 4.4. Evaluation de l'activité biologique des particules

L'évaluation de l'activité biologique des particules de SiC se déroule sur plaque 96 puits. Elle consiste à évaluer l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ), l'endommagement et la mort cellulaire (LDH) et le stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par dosage des paramètres correspondant dans le milieu extracellulaire. Pour se faire, on utilisera principalement la spectrométrie UV-visible et la spectrofluorométrie (Thermolab, Ascent Multiscan et Fluoroscan).

##### 4.4.1. Etat d'inflammation : TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine produite et sécrétée par les cellules dans le milieu extracellulaire au cours de la réaction inflammatoire. Elle constitue un indicateur du niveau de l'inflammation provoqué par les particules de SiC sur les macrophages.

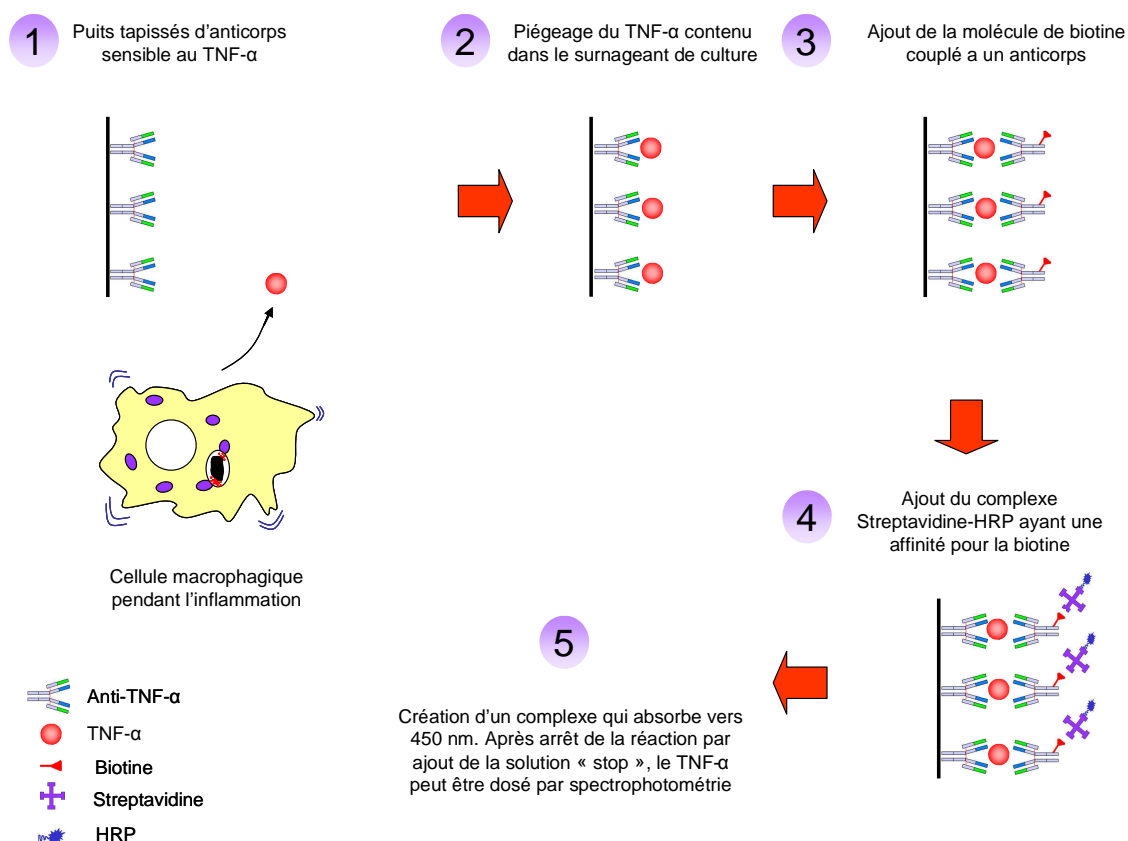
Dans la pratique, les cellules sont incubées avec les particules dans leur milieu biologique (1.10<sup>5</sup> MA/puits). Après 24 heures d'incubation, le surnageant est prélevé pour être analysé à l'aide d'un kit de dosage ELISA (Figure 43).

1 et 2 50  $\mu$ l du surnageant sont placés dans des puits tapissés par des anticorps capables de fixer le TNF- $\alpha$ . Après 2 heures d'incubation, les puits sont lavés avec une solution tampon.

3 Un anticorps couplé à une molécule de biotine est ajouté. Après une période d'incubation de 2 heures, les puits sont à nouveau lavés, pour enlever le surplus de réactifs qui n'a pas réagi.

4 On introduit ensuite la solution colorée correspondant à un complexe enzymatique (Horseradish Peroxydase (HRP) / Streptavidine) ayant une affinité pour la biotine.

5 Après 30 minutes d'incubation, la solution « stop » est finalement ajoutée. La coloration des puits passe alors du bleu au jaune et l'absorbance peut être mesurée par spectrophotométrie UV-visible à 450 nm. La concentration en TNF- $\alpha$  (pg/ml) est ensuite obtenue via des droites d'étalonnages réalisées pour chaque nouvel essai.



**Figure 43 : Principe du dosage ELISA du TNF- $\alpha$**

#### 4.4.2. Endommagement et mort cellulaire : LDH

La LDH (Lactate Déshydrogénase) est une enzyme présente dans le cytoplasme des cellules vivantes. En cas d'endommagement ou de mort cellulaire, la LDH est libérée dans le milieu. Témoin de la mort cellulaire, son dosage permet d'évaluer la cytotoxicité des particules de SiC.

Pour déterminer la concentration en LDH dans le milieu extracellulaire, on utilise les propriétés catalytiques de l'enzyme (Candeias et al., 1998). Celle-ci catalyse l'hydrolyse du lactate en pyruvate (Figure 44). Le pouvoir réducteur  $\text{NADH} + \text{H}^+$  est ensuite utilisé comme réactif limitant d'une réaction catalysée par une seconde enzyme : la diaphorase. Cette enzyme catalyse une réaction colorimétrique, en transformant son substrat (Résazurin) en un produit fluorescent (Résorufin). L'analyse par spectrofluorométrie ( $530_{\text{Ex}} / 590_{\text{Em}}$ ) est proportionnelle à l'activité de la LDH dans le milieu extracellulaire.

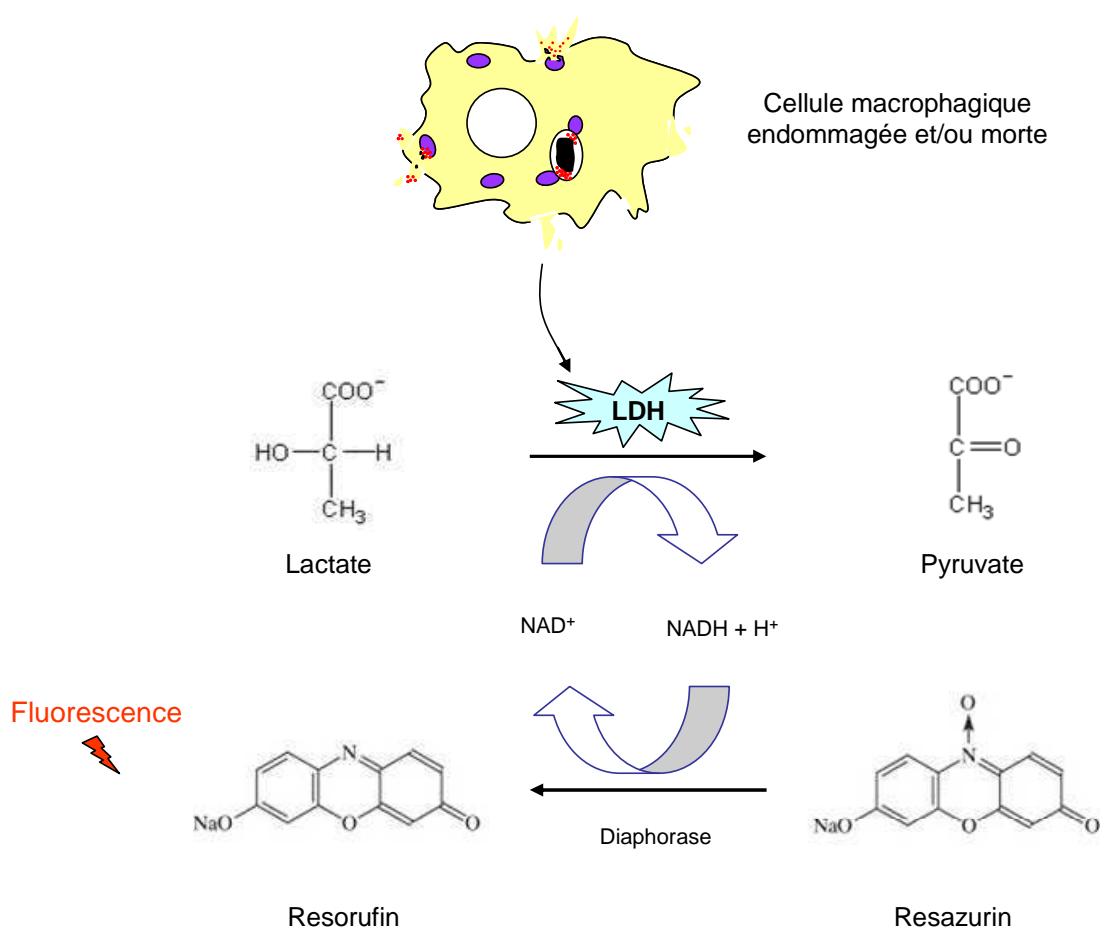


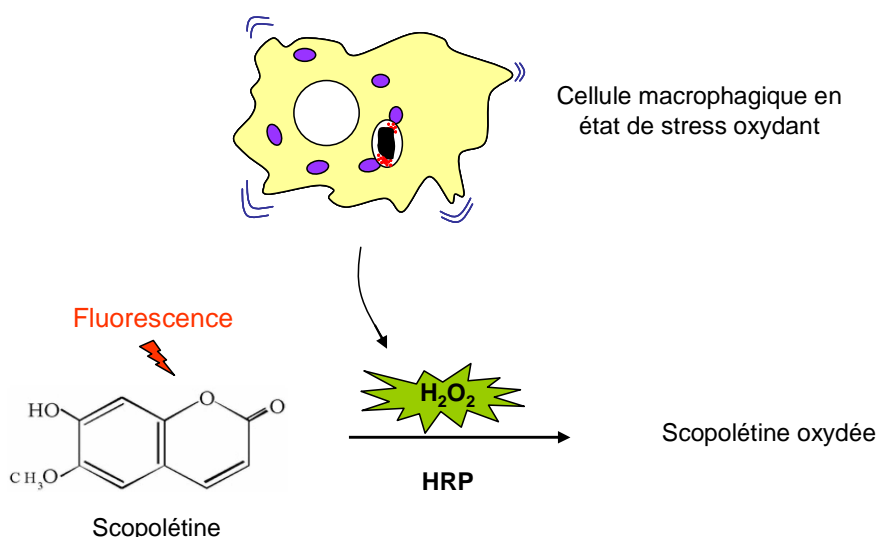
Figure 44 : Principe du dosage de la LDH

Expérimentalement, les macrophages alvéolaires sont incubés avec les particules de SiC ( $1.10^5$  MA / puits) dans leur milieu biologique à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Après 24 heures d'incubation, la LDH est dosée dans les puits de culture suivant le principe décrit ci-dessus. On obtient la quantité maximum de LDH pouvant être libérée en introduisant un puissant agent de lyse cellulaire dans des puits témoins. Les résultats obtenus sont alors exprimés en pourcentage de LDH libérée.

#### 4.4.3. Stress oxydant : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), principale substance du pouvoir oxydant des cellules, est un acteur central du stress oxydant. Le dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en milieu extracellulaire à pour but d'évaluer le stress cellulaire provoqué par les particules minérales sur les cellules.

La quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> secrétée par les cellules est dosée suivant la méthode de De la Harpe et Nathan (Nathan et Root, 1977 ; Nathan et al., 1979 ; De la Harpe et Nathan, 1985 ; Nathan, 1987 ; Bruch et al., 2004). Expérimentalement, on se place dans un milieu tampon de KRPG (*Krebs Ringer Phosphate buffer Glucose*) permettant d'éviter les diverses interactions avec le milieu de culture (rouge phénol, etc.). On utilise une solution de dosage contenant de la scopolétine (30µM), NaN<sub>3</sub> (1 mM), de la horseradish peroxidase (*HRP*) (1 unité purpurogallin/ml)\* et du phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 100 ng/ml). La scopolétine, fluorescente à l'état naturel, constitue l'agent de dosage (Figure 45). En présence de peroxyde d'hydrogène, son oxydation est catalysée par la HRP. La baisse enregistrée de la fluorescence sur une période de 90 minutes (355<sub>Ex</sub> / 460<sub>Em</sub>) permet d'estimer la quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nmol/10<sup>6</sup> MA).



**Figure 45 : Principe du dosage du peroxyde d'hydrogène (De la Harpe et Nathan, 1985)**

\* Les unités catalytiques sont déterminées au cours de la réaction d'oxydation du pyrogallol en purpurogallin par le peroxyde d'hydrogène à pH=6 et 20°C. Une unité catalytique permet de transformer en 20 secondes 1 mg de pyrogallol en purpurogallin.

Ainsi, à partir de cette méthode de dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en milieu extracellulaire, deux tests sont effectués pour évaluer le stress oxydant :

- “*Stress aigu*” – paramètre ROS

Le test décrit ci-dessus qui correspond à la détermination du stress aigu sur 90 minutes (De la Harpe et Nathan, 1985 ; Bruch et al., 2004). Il permet de déterminer le stress oxydant provoqué par les particules dans les premiers temps de l’interaction cellule/particule. Le paramètre correspondant est appelé ROS (De la Harpe et Nathan, 1985 ; Bruch et al., 2004). Brièvement, les macrophages alvéolaires sont incubés avec les particules de SiC (3.10<sup>5</sup> MA / puits) dans le KRPG pendant 90 minutes à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Au cours de cette période, le peroxyde d’hydrogène produit par les cellules est dosé par la méthode décrite ci-dessus. Les résultats obtenus sont exprimés en nmol/10<sup>6</sup> MA.

- “*Stress chronique*” – paramètre TOX

Un autre test, adapté par Bruch et al. dans le cadre de ses travaux, s’effectue après un temps d’interaction cellule/particule plus important et s’apparente à l’évaluation d’un stress chronique (Bruch et al., 1993b ; Bruch et al., 1996 ; Bruch et al., 2004). Pour notre part, nous effectuons ce test après une interaction cellule/particule de 24 heures. Le paramètre correspondant est appelé TOX. Les cellules sont incubées avec les particules de SiC (3.10<sup>5</sup> MA / puits) dans le DMEM à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Après 24 heures d’incubation, les puits sont délicatement vidés et nettoyés avec la solution de KRPG pour y introduire la solution de dosage. Les résultats sont exprimés en pourcentage en attribuant la valeur 100% au témoin positif de toxicité (Bruch et al., 2004).

Finalement, la mise en parallèle de ces deux paramètres (ROS et TOX) nous permettra d’avoir un indicateur du stress oxydant des cellules.

### Conclusion

L’ensemble de ces tests nous servira à estimer l’activité biologique des différentes particules de SiC. Les résultats relatifs à des domaines distincts de la réponse cellulaire (état d’inflammation, mort cellulaire, stress oxydant) permettront d’avoir une idée de la toxicité globale des particules de SiC.

## CONCLUSION

Il existe un risque d'inhalation pour les personnes exposées aux particules. Etudier l'activité biologique des particules, c'est appréhender les mécanismes qui la régissent permettant ainsi de supprimer le danger. Contrairement à de nombreuses études ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ , particules diesels, etc.), pas ou très peu de données existent sur l'activité biologique des poudres de SiC.

Le carbure de silicium a des propriétés exceptionnelles qui justifient sa demande toujours plus grande sur le marché. Produites industriellement par le procédé Acheson, les poudres de SiC sont susceptibles de se disséminer dans les environnements de travail, comme le soulignent les diverses études épidémiologiques réalisées. L'ensemble des observations, a permis de conclure à l'existence d'un possible risque caractérisé par une diminution des fonctions pulmonaires et l'apparition de pathologies respiratoires pour les travailleurs des usines de SiC. Certains (Massé et al., 1988 ; Durand et al., 1991) affirment même que ce type de pneumoconiose observé est suffisamment atypique et distinct pour être reconnu comme une entité spécifique.

Ainsi, à titre préventif, il apparaît nécessaire de mener des expériences plus approfondies sur des particules grossières, fines et ultrafines de SiC, en conjuguant les caractérisations physico-chimiques et l'évaluation de l'activité biologique par la mise en place de tests *In Vitro*.

Dans la cavité alvéolaire, les macrophages alvéolaires représentent la première ligne de défense face aux particules inhalées. Ils participent et modulent la réaction inflammatoire locale en se débarrassant des particules par phagocytose. Au cours de l'interaction cellule/particule, le macrophage activé va sécréter des molécules chimiques caractéristiques de l'état d'inflammation ( $\text{TNF-}\alpha$ ), de la mort cellulaire (LDH) et du stress oxydant ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Le suivi de ces paramètres nous permettra d'évaluer l'intensité de la réponse cellulaire et par conséquent l'activité biologique globale des particules de SiC testées.

---

De plus, les propriétés physiques et chimiques des particules jouent un rôle primordial dans l'intensité de la réponse cellulaire et la génération de radicaux libres ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ). Bien qu'il soit souvent difficile de statuer définitivement sur l'implication des différents paramètres, nous essaierons de conjuguer en parallèle le travail de caractérisation physico-chimique et de l'activité biologique des particules de SiC.

Ainsi, « ... *il est illusoire de vouloir faire choix d'une métrique unique à mettre en relation avec les divers effets biologiques possibles des particules... ; il faut plutôt considérer que la meilleure métrique pour un effet considéré est fonction de cet effet et des mécanismes qui le gouvernent* » (Hervé-Bazin, 2007).

---

## **CHAPITRE IV :**

### **RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION**

#### **- LES PARTICULES INDUSTRIELLES -**

Dans cette première partie, nous allons aborder uniquement les résultats obtenus avec les particules industrielles de SiC élaborées avec le procédé Acheson dans une usine de fabrication typique. Ces poudres, directement récupérées en sortie d'usine, ne subissent aucun traitement (« poudres brutes ») et sont utilisées telles quelles dans les unités de recherche et de fabrication. Par souci de clarté, nous allons procéder de la façon suivante :

- Dans un premier temps, nous allons présenter le protocole opératoire utilisé pour récupérer les fractions alvéolaires ( $D_{\max} \leq 10 \mu\text{m}$ ) contenues dans les poudres ayant des distributions granulométriques larges (SiC A1, A3 et A4). Les autres poudres (SiC A2 et A5) ont déjà des caractéristiques qui répondent à la définition de la fraction alvéolaire. De cette façon nous disposerons de particules industrielles susceptibles d'atteindre les alvéoles pulmonaires et d'interagir avec les macrophages alvéolaires (Chap II, Figure 2).
- Dans un second temps, nous présenterons les résultats des caractérisations physico-chimiques réalisées sur les particules industrielles (taille, surface, morphologie, chimie, structure cristalline, état de surface et activité radicalaire).
- Dans un troisième temps, nous présenterons les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité biologique de ces particules industrielles (état d'inflammation, mort cellulaire, stress oxydant).
- Enfin, après analyse des résultats, nous discuterons des possibles corrélations entre l'évolution de l'activité biologique globale (modèle vecteur) et les principales caractéristiques des particules industrielles.



## 1. Récupération de la fraction alvéolaire

Les poudres industrielles de SiC A1, A3 et A4 ont des distributions granulométriques larges. Par conséquent, la première étape consiste à récupérer la fraction alvéolaire contenue dans la poudre brute, susceptible de pénétrer dans le poumon profond.

Nous avons donc mis au point un dispositif expérimental basé sur le principe de fonctionnement des lits fluidisés : « l'élutriateur vertical » (Figure 46). L'élutriation est un procédé par lequel les particules sont mises en suspension via un gaz vecteur (air) traversant le lit de particules.

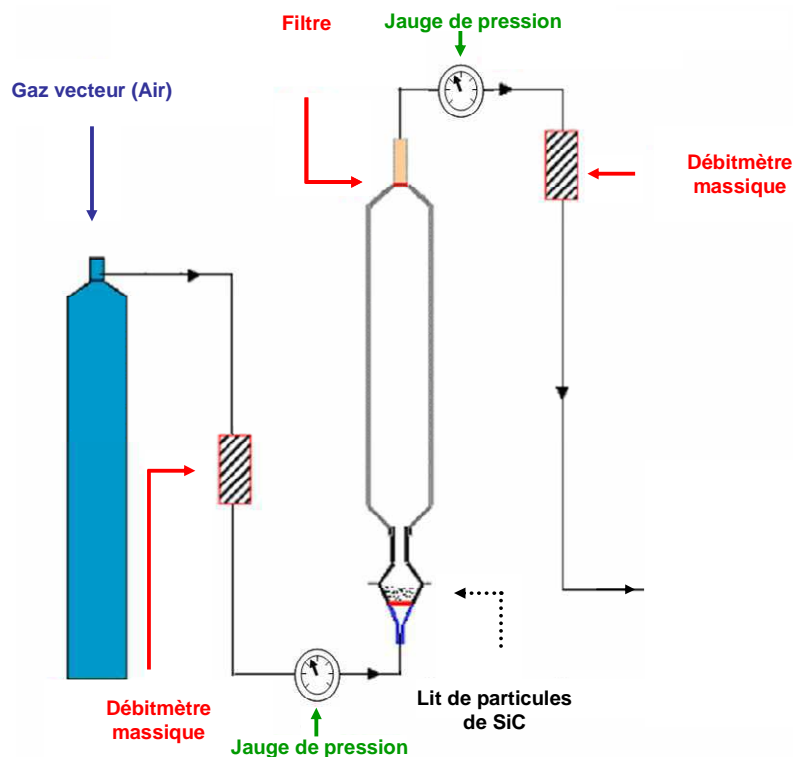
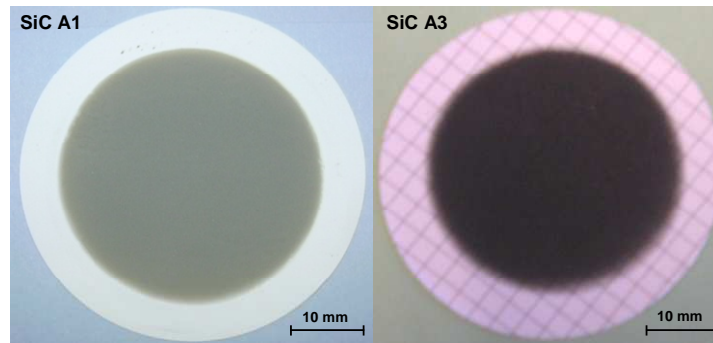


Figure 46 : Schéma du dispositif de récupération des fractions alvéolaires

En théorie, quand la vitesse à travers le lit excède la vitesse terminale des particules, celles-ci sont entraînées et collectées sur un filtre (porosité = 0,2  $\mu\text{m}$ , diamètre = 47 mm, Whatman) en sortie de colonne (Figure 47).



**Figure 47 : Aspect d'un filtre après une opération d'éluutriation : poudres industrielles de SiC A1 et A3**

Les caractéristiques physico-chimiques propres des particules affectent leur aptitude à la fluidisation. Dans la pratique, on se reporte à la classification de Geldart (Geldart, 1972/1973), selon laquelle les poudres peuvent appartenir à différents groupes suivant leur comportement au cours de la fluidisation.

Brièvement, les groupes A et B correspondent à des poudres relativement fluidisables. Les groupes C et D correspondent à des particules qu'il est très difficile voire impossible de fluidiser. Ceci est principalement dû aux forces d'interactions interparticulaires (Van Der Waals, électrostatiques, etc.) qui s'opposent aux forces gravitationnelles. Dans notre cas, les poudres de SiC A1, A3 et A4 appartiennent globalement à la catégorie A et/ou B de la classification de Geldart et sont donc facilement fluidisables.

Les particules éjectées du lit fluidisé sont soumises principalement à deux forces : la force de traînée du gaz fluidisant et l'accélération de la pesanteur. La résolution de l'équation d'équilibre permet d'accéder à la vitesse terminale ( $U_t$ ) d'une particule :

$$U_t = 4 \cdot g \cdot D_p \cdot \left( \frac{\rho_p - \rho_f}{3 \cdot \rho_f \cdot C_d} \right)^{0,5}$$

Notations et symboles:

$U_t$  = vitesse terminale des particules ( $LT^{-1}$ )

$g$  = constante de gravitation ( $LT^{-2}$ )

$D_p$  = diamètre moyen des particules (L)

$\rho_p, \rho_f$  = masse volumique respective des phases solide et fluide ( $ML^{-3}$ )

$C_d$  = coefficient de traînée

En théorie, cette donnée est essentielle pour la détermination de la constante d'éluutriation ( $K$ ). En effet, le taux d'éluutriation dans un système est proportionnel à la concentration des fines particules restantes dans le lit (Leva et al., 1946) :

$$-\frac{dm_e}{dt} = K \cdot A \cdot \frac{m_e}{m}$$

Bien que le calcul de  $K$  soit fondé sur des relations semi-empiriques, de nombreuses études ont permis d'établir des corrélations pour cette valeur (Yagi et Aochi, 1955 ; Geldart et al. 1986 ; Li et Kato, 2001). Ainsi, la formule de Geldart obtenue en utilisant des particules de classe A ou B, permet d'aboutir à la relation suivante :

$$K = \rho_f \cdot U \cdot 23,7 \cdot \exp\left(-5,4 \cdot \frac{U_t}{U}\right)$$

La constante d'éluatriation dépend principalement de la taille des particules et de la vitesse du gaz fluidisant. L'accès à sa valeur permet d'évaluer le flux massique de particules. Dans la pratique, on détermine la masse cumulée de particules éluatriées  $M(t)$  en fonction du temps (Tasirin et Geldart, 1998 ; Rodriguez et al., 2000) :

$$M(t) = m_{e,0} \left(1 - \exp\left(\frac{K \cdot A \cdot t}{m}\right)\right)$$

Cette formule correspond à l'éluatriation d'une poudre monodisperse. Or, dans la réalité, les échantillons sont polydisperses. Par conséquent, la masse totale éluatriée est alors égale à la somme des masses éluatriées pour chaque taille de particules. La fraction massique de fines particules évoluant au cours du temps, l'expression générale du flux massique ( $E_p$ ) s'écrit alors :

$$E_p = K \cdot A \cdot \left(\frac{m_{e,0} - M(t)}{m - M(t)}\right)$$

Notations et symboles:

$m$  = masse totale du lit (M)

$m_e$  = masse des particules éluatriables restante dans le lit au temps  $t$  (M)

$m_{e,0}$  = masse initiale des particules éluatriables (M)

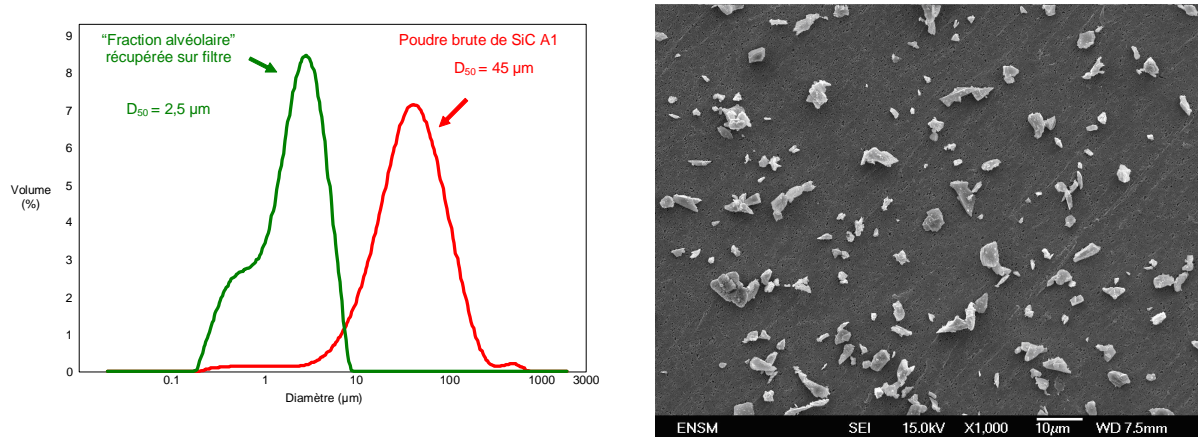
$K$  = constante d'éluatriation ( $ML^{-2}T^{-1}$ )

$A$  = section du lit ( $L^2$ )

$M(t)$  = masse cumulée de particules éluatriées en fonction du temps ( $MT^{-1}$ )

$E_p$  = flux massique de fines particules ( $MT^{-1}$ )

Cependant, dans la pratique, des difficultés existent pour corréler les résultats théoriques et expérimentaux. Ainsi, pour collecter la bonne taille de particules, on ajuste les débits de gaz afin de contrôler la perte de charge dans la colonne et ainsi avoir une taille de particules répondant à la définition de la fraction alvéolaire (Figure 48).



**Figure 48 : Exemple de récupération de la fraction alvéolaire contenue dans la poudre industrielle de SiC A1 : distribution granulométrique ( $D_{\max} \leq 10 \mu\text{m}$  ;  $D_{50} \approx 2,5 \mu\text{m}$ ) et images MEB-FEG des particules correspondantes récupérées sur les filtres**

Les fractions alvéolaires contenues dans les poudres de SiC A1, A3 et A4 ont ainsi été récupérées. Nous rappelons que les poudres de SiC A2 et A5, correspondent à des poudres fines répondant de fait à la définition de la fraction alvéolaire ( $D_{\max} \leq 10 \mu\text{m}$ ).

Seule, la poudre de SiC A3, dont la distribution granulométrique des particules de départ est très large ( $D_{50} \approx 200 \mu\text{m}$ ), subit une ségrégation de phase importante au cours de cette opération. En effet, les particules de SiC, qui forment les gros grains de la poudre, restent dans le lit alors que la partie fine riche en impuretés ( $\text{SiO}_2$  et C) est emportée et se retrouve sur le filtre en sortie de colonne. On rappelle que cette poudre correspond à un indicateur représentatif de l'atmosphère de travail des usines de fabrication de ces poudres de SiC.

Cette étape nous permet préalablement de récupérer la fraction alvéolaire contenue dans les poudres industrielles de distribution granulométrique large. Nous disposons désormais, pour chaque poudre, des particules susceptibles de se retrouver dans la cavité alvéolaire après inhalation et donc d'interagir avec les macrophages alvéolaires.

Il convient maintenant de déterminer les propriétés physico-chimiques de chacune de ces poudres.

## 2. Propriétés physico-chimiques des poudres

### 2.1. Paramètres physiques : taille, surface et morphologie

#### 2.1.1. Taille et surface

Effectuées par granulométrie laser, ces analyses nous donnent une estimation de la taille des particules. Compte tenu des formes très irrégulières des particules industrielles (Figure 49), nous nous éloignons de l'hypothèse de sphéricité des grains intervenant dans le traitement mathématique des données. Cela étant, les valeurs obtenues constituent tout de même un indicateur de la taille des particules en prenant en compte le diamètre médian ( $D_{50}$ ) des distributions granulométriques. Il est donc utile de coupler ces données avec les valeurs de la surface spécifique, mesurées par la méthode BET (Tableau 8).

Echantillons	Granulométrie diamètre médian $D_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	Surface spécifique BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
SiC A1	$\approx 2,5$	4,0
SiC A2	$\approx 0,5$	11,0
SiC A3	$\approx 6,0$	3,0
SiC A4	$\approx 2,5$	3,5
SiC A5	$\approx 0,8$	8,5

**Tableau 8 : Analyse granulométrique et surface spécifique des particules industrielles de SiC**

Ces résultats et l'analyse des distributions granulométriques (figures non présentées) permettent de constater que les particules industrielles sont polydisperses, avec une contribution relative de particules grossières, fines et ultrafines. De plus, elles présentent très peu de porosité, affichant des valeurs de surface spécifique très faibles.

De fait, il semble que les poudres A2 et A5 soient plus fines avec moins de particules grossières et des valeurs de surface spécifiques voisines de  $10 \text{ m}^2/\text{g}$ . A contrario, les poudres A1, A3 et A4 sont plus grossières avec des surfaces spécifiques voisines de  $3 \text{ m}^2/\text{g}$ .

#### 2.1.2. Morphologie des particules

Les observations en microscopie électronique au MEB-FEG nous permettent d'obtenir des informations sur la taille, la forme et l'aspect de surface des particules (Figure 49).

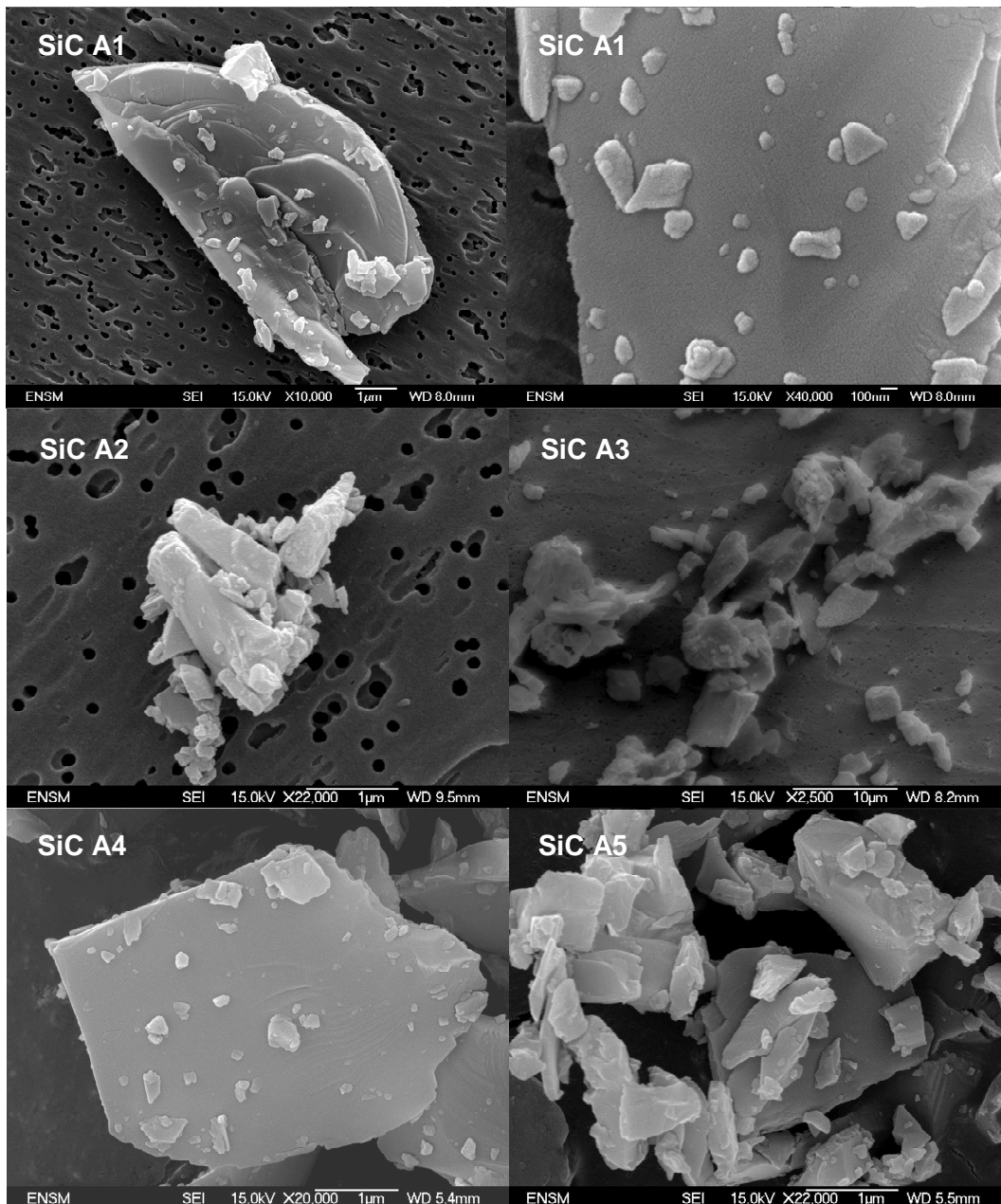
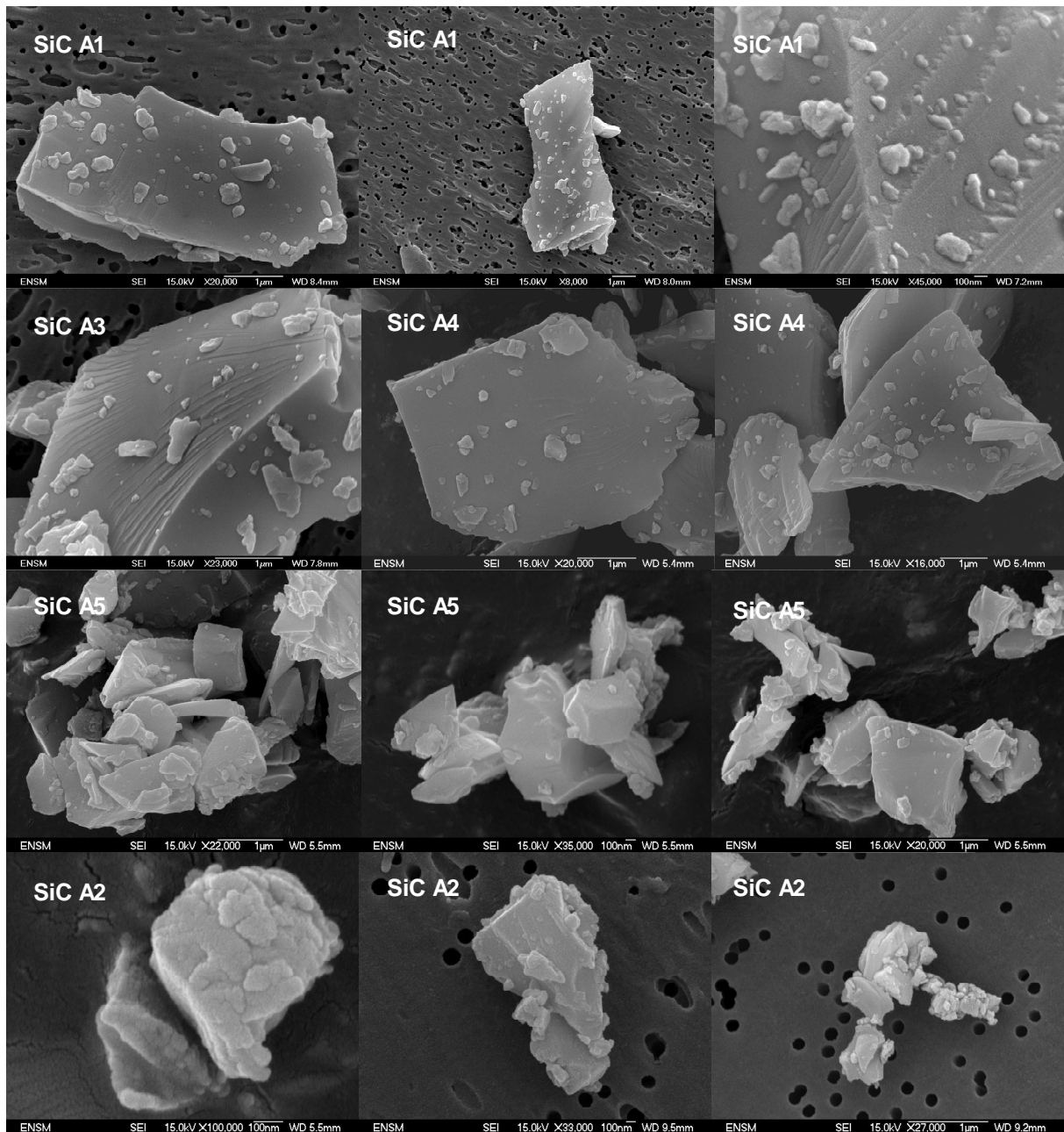


Figure 49 : Images MEB-FEG des particules industrielles de SiC obtenues par le procédé Acheson

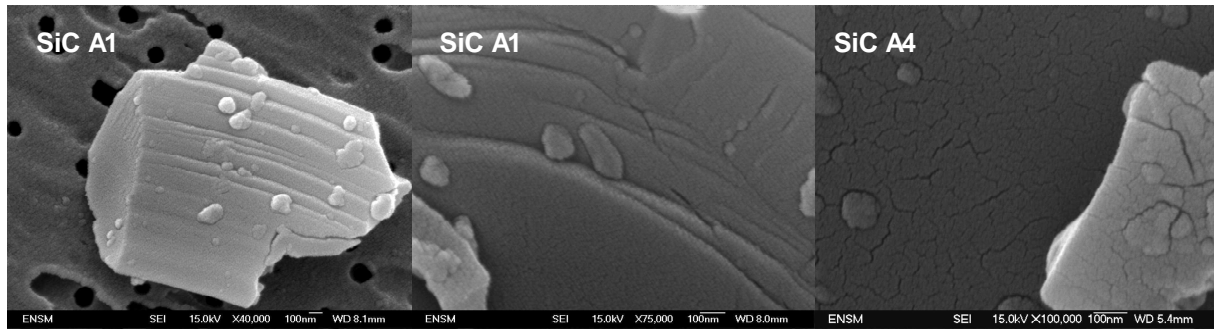
Les échantillons sont polydisperses avec une morphologie générale identique. Loin d'être des sphères, les grains ont une forme très irrégulière (Figure 49) avec des tailles très variées, ce qui corrobore les observations faites précédemment sur l'analyse granulométrique.

En général, l'aspect de surface des grains est lisse avec des arêtes coupantes, probablement façonnées par les multiples étapes de broyage et purification des poudres au cours du procédé d'élaboration. De plus, on observe la présence de particules nanométriques et submicroniques fixées sur des particules de taille supérieure (Figure 50), ce qui résulte vraisemblablement du frittage réactif qui a lieu aux très hautes températures de synthèse du SiC (Chap I, 4.2.1).



**Figure 50 : Images MEB-FEG de particules submicroniques et nanométriques fixées sur des particules de taille plus importante**

Par ailleurs, on peut également souligner la présence à l'échelle nanométrique, de ce qui s'apparente à des nano-fissures (Figure 51) provoquées vraisemblablement par les conditions d'obtention de ces particules (traitements thermiques et mécaniques). En effet, les particules de SiC sont très dures (ChapI, 4.1.1) et donc les énergies mises en jeu lors du broyage peuvent être localement très importantes.



**Figure 51 : Images MEB-FEG de « nano-fissures » sur certaines particules industrielles de SiC**

Cet aspect de surface, caractéristique des particules industrielles, est observé pour l'ensemble des échantillons. Néanmoins, il est très nettement visible pour les particules grossières (A1, A3 et A4) mais se fait plus rare lorsque la taille des particules diminue (A2 et A5) (Figure 50). Ainsi, ces observations sont très importantes car elles peuvent expliquer une réactivité de surface très spécifique des particules industrielles de SiC (Fubini, 1998) et soulignent des différences entre les échantillons A1, A3, A4 qui contiennent plus de particules grossières avec ce type de morphologie à l'inverse des particules plus fines A2 et A5.

### Conclusion

Ces caractéristiques physiques (taille, surface, morphologie) sont spécifiques des poudres de SiC obtenues par le procédé Acheson. La morphologie générale est caractérisée principalement par un aspect de surface lisse et la présence de particules nanométriques et submicroniques fixées sur des particules plus larges. Des différences sont observables entre les divers échantillons : les particules de SiC A1, A3 et A4 sont plus grossières ( $S_p \approx 3-4 \text{ m}^2/\text{g}$ ) à l'inverse des particules A2 et A5 plus fines ( $S_p \approx 8-11 \text{ m}^2/\text{g}$ ).



## 2.2. Paramètres chimiques

### 2.2.1. Analyse cristallographique

L'analyse de la structure cristallographique des particules par diffractométrie des rayons X permet d'obtenir des informations sur la nature et la proportion des différentes phases cristallisées contenues dans les poudres industrielles de SiC. Les diffractogrammes obtenus permettent d'observer principalement la présence des polytypes de SiC (6H, 4H, 15R) et la présence d'impuretés résiduelles (Quartz, Cristobalite, Silicium et Carbone). En raison du nombre important d'acquisitions, nous avons choisi volontairement de ne présenter qu'un diffractogramme correspondant à une poudre impure afin de mieux visualiser les pics relatifs à certaines impuretés résiduelles (Figure 52).

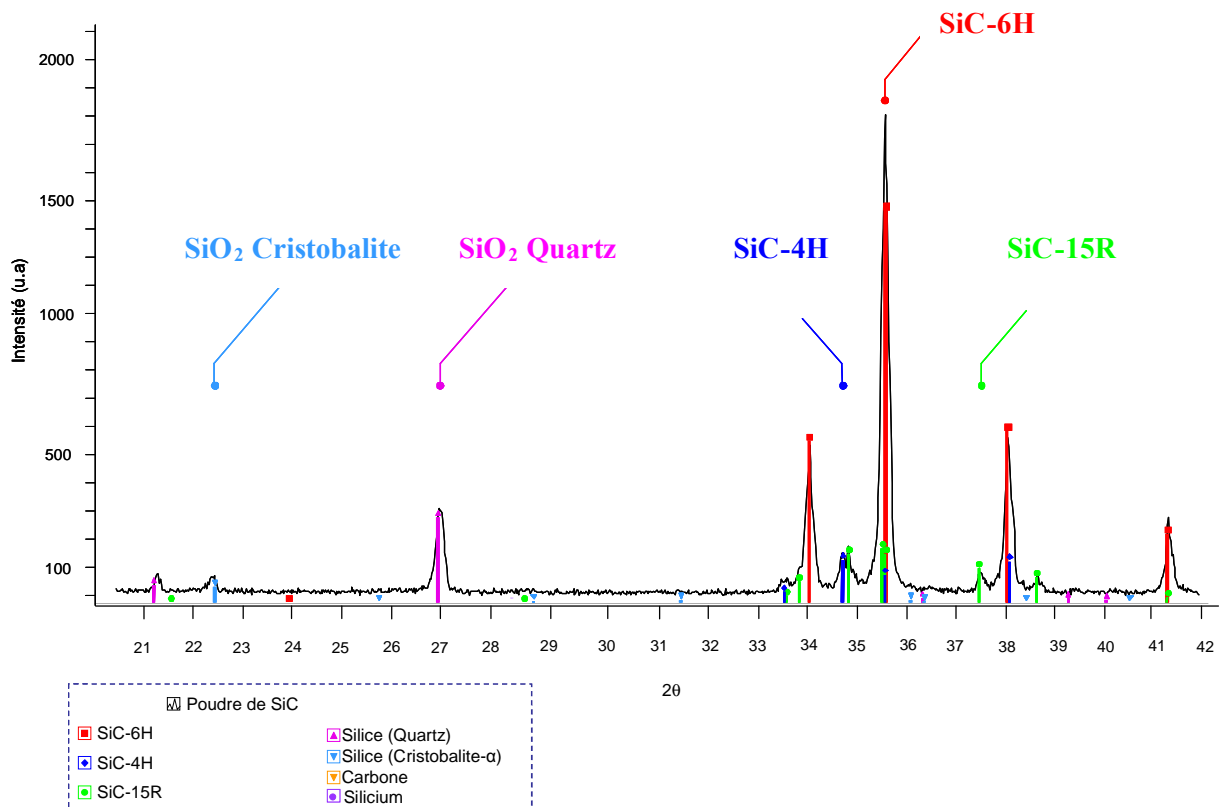


Figure 52 : Allure du diffractogramme d'une poudre industrielle « impure » de SiC

Par suite, le traitement de ces diffractogrammes par analyse semi-quantitative (Rietveld), nous permet d'avoir une estimation de la proportion (% massique) des diverses phases présentes dans nos échantillons (Tableau 9).

Echantillon	SiC- $\alpha$			SiC- $\beta$	SiO <sub>2</sub> quartz	SiO <sub>2</sub> cristobalite	Si	C
	SiC-6H	SiC-4H	SiC-15R	SiC-3C				
SiC A1	91	7	< 1	—	—	< 1	< 1	—
SiC A2	91	7	2	—	—	—	—	—
SiC A3	53	7	5	—	9	5	1	20
SiC A4	90	7	2	—	< 1	—	< 1	< 1
SiC A5	90	3	7	—	—	—	—	—

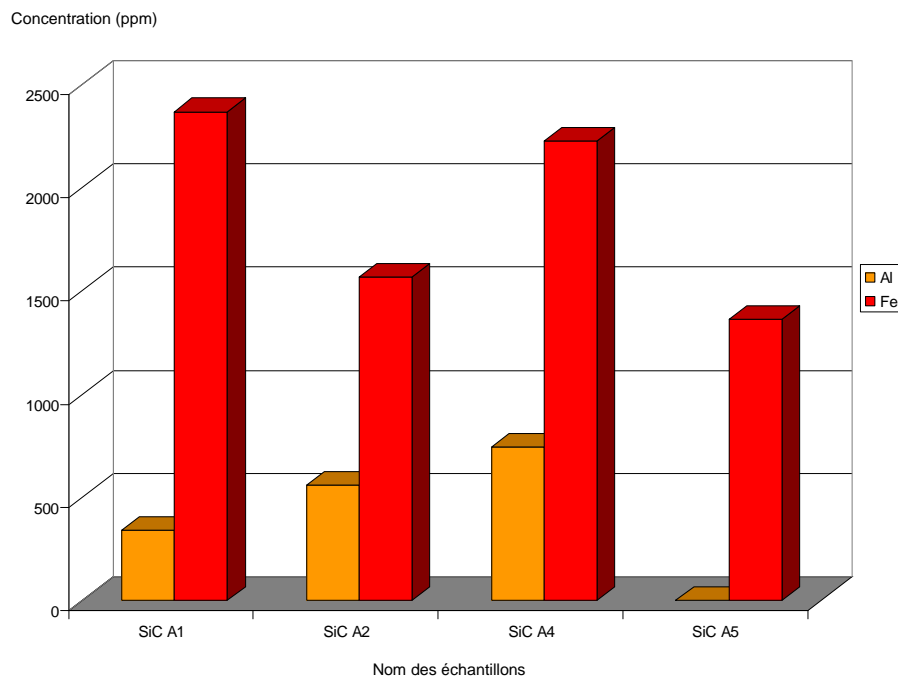
**Tableau 9 : Analyse semi quantitative des poudres industrielles par diffraction des rayons X (Rietveld)**

A l'exception de la poudre A3, l'ensemble des échantillons correspond à des poudres pures de SiC- $\alpha$  (%SiC  $\geq$  98%) avec très majoritairement du SiC-6H et en plus faible proportion du SiC-4H et du SiC-15R. On observe, néanmoins la présence de certaines impuretés en traces, principalement de la silice, du silicium et du carbone.

La poudre de SiC A3 est très impure avec des taux élevés de carbone et de silice. Comme nous l'avons évoqué précédemment (Chap IV, 1) cette poudre ne correspond plus vraiment à une poudre pure de SiC même si le carbure de silicium en reste le constituant majoritaire (%SiC  $\approx$  65%).

### 2.2.2. Composition chimique

Les résultats de l'analyse chimique par ICP (Figure 53) nous permettent d'avoir accès à la nature et à la proportion des impuretés métalliques contenues dans les poudres de SiC (Chap II, 4.2.3). Ces impuretés, principalement Fe et Al, sont connues pour jouer un rôle primordial dans l'activité biologique des particules (Fubini et Hubbard, 2003 ; Fubini et al., 2004).



**Figure 53 : Concentration des impuretés métalliques de fer et d'aluminium contenues dans les poudres industrielles de SiC**

Pour faciliter l'exploitation des résultats, la poudre de SiC A3 n'est pas représentée ( $\%Fe \approx 20\ 000\ ppm$  ;  $\%Al \approx 1300\ ppm$ ). On constate que l'ensemble des particules industrielles présente des proportions importantes en fer ( $1350\ ppm \leq \%Fe \leq 2400\ ppm$ ). L'aluminium est présent en quantité significative ( $300\ ppm \leq \%Al \leq 750\ ppm$ ), excepté dans la poudre de SiC A5.

Ces impuretés métalliques sont prépondérantes dans les particules industrielles mais il semble difficile d'en déterminer l'origine, due, vraisemblablement pour une part aux impuretés des réactifs utilisés pour leurs synthèses, et d'autre part, aux multiples étapes de raffinage (Chap I, 4.2).

De plus, les résultats de l'analyse LECO et de fluorescence X, permettent d'obtenir une indication des teneurs en oxygène et en carbone libre (% massique) ainsi que sur la stœchiométrie de nos poudres (Tableau 10).

Echantillon	% O	% C <sub>libre</sub>	C/Si at.
SiC A1	0,4	0,6	0,98
SiC A2	1,0	1,3	1,00
SiC A3	6,0	17,5	1,66
SiC A4	0,3	0,8	0,99
SiC A5	0,5	0,4	0,98

**Tableau 10 : Composition chimique des poudres industrielles de SiC**

A l'exception de la poudre A3, les poudres analysées sont stœchiométriques avec des rapports C/Si voisins de 1. On observe de légères différences en oxygène et en carbone libre mais ces teneurs restent très faibles et voisines de 1%.

L'échantillon A3, contient des taux élevés de carbone libre et d'oxygène (%O  $\approx$  6 %, %C<sub>libre</sub>  $\approx$  17,5 %). Ces analyses sont en accord avec nos observations précédentes et confirment le caractère atypique de cette poudre. A l'inverse des autres poudres de SiC, la forte proportion en impuretés dans la fraction alvéolaire (SiO<sub>2</sub> et C) conduit à une poudre de SiC avec un rapport C/Si très éloigné de la stœchiométrie (C/Si  $\approx$  1,66) et qui ne correspond plus à des particules pures de SiC.

### 2.2.3. Etat de surface des poudres

L'analyse de surface par XPS est utilisée pour mettre en évidence des différences de la composition de surface entre les divers échantillons. Les pics Si<sub>2p</sub>, Si<sub>2s</sub>, C<sub>1s</sub> et O<sub>1s</sub> ont été détectés sur une zone d'énergie de liaison (E<sub>l</sub>) allant de 0 à 900 eV.

Le signal relatif à l'oxygène (O<sub>1s</sub>) est la signature, pour une part, d'une contamination résiduelle de surface (pollution atmosphérique), et d'autre part, de la présence d'une fine couche de silice qui recouvre les grains de SiC et qui leur confère entre autres ses propriétés remarquables de résistance à l'oxydation (Filipuzzi, 1991 ; Schwier et al., 1997). Ainsi, pour l'interprétation de nos données, à l'exemple de nombreuses études (Filipuzzi, 1991 ; Pesant, 2005 ; Shimoda et al., 2007), nous pouvons faire l'hypothèse que la surface des grains de SiC est recouverte par une couche de silice (SiO<sub>2</sub>) avec une zone intermédiaire d'oxydes mixtes

(SiO<sub>x</sub>C<sub>y</sub>) entre la silice et le carbure de silicium. Des impuretés, principalement de carbone libre (C), peuvent être présentes en surface de ces mêmes grains.

Compte tenu du libre parcours moyen des électrons (IMFP-TPP2M ; Ekoué, 2002) dans de la silice et du carbure de silicium, les analyses s'effectuent sur une épaisseur de quelques nanomètres (0,5 à 5 nm) à partir de la surface du matériau. Des fenêtres de mesure ont été définies pour l'analyse de chaque pic, respectivement pour O<sub>1s</sub> (E<sub>1</sub> = 540–528 eV), C<sub>1s</sub> (E<sub>1</sub> = 292–280 eV) et Si<sub>2p</sub> (E<sub>1</sub> = 108–96 eV). Le pourcentage atomique et les informations relatives à la décomposition spectrale des signaux correspondants ont été résumés dans le Tableau 11.

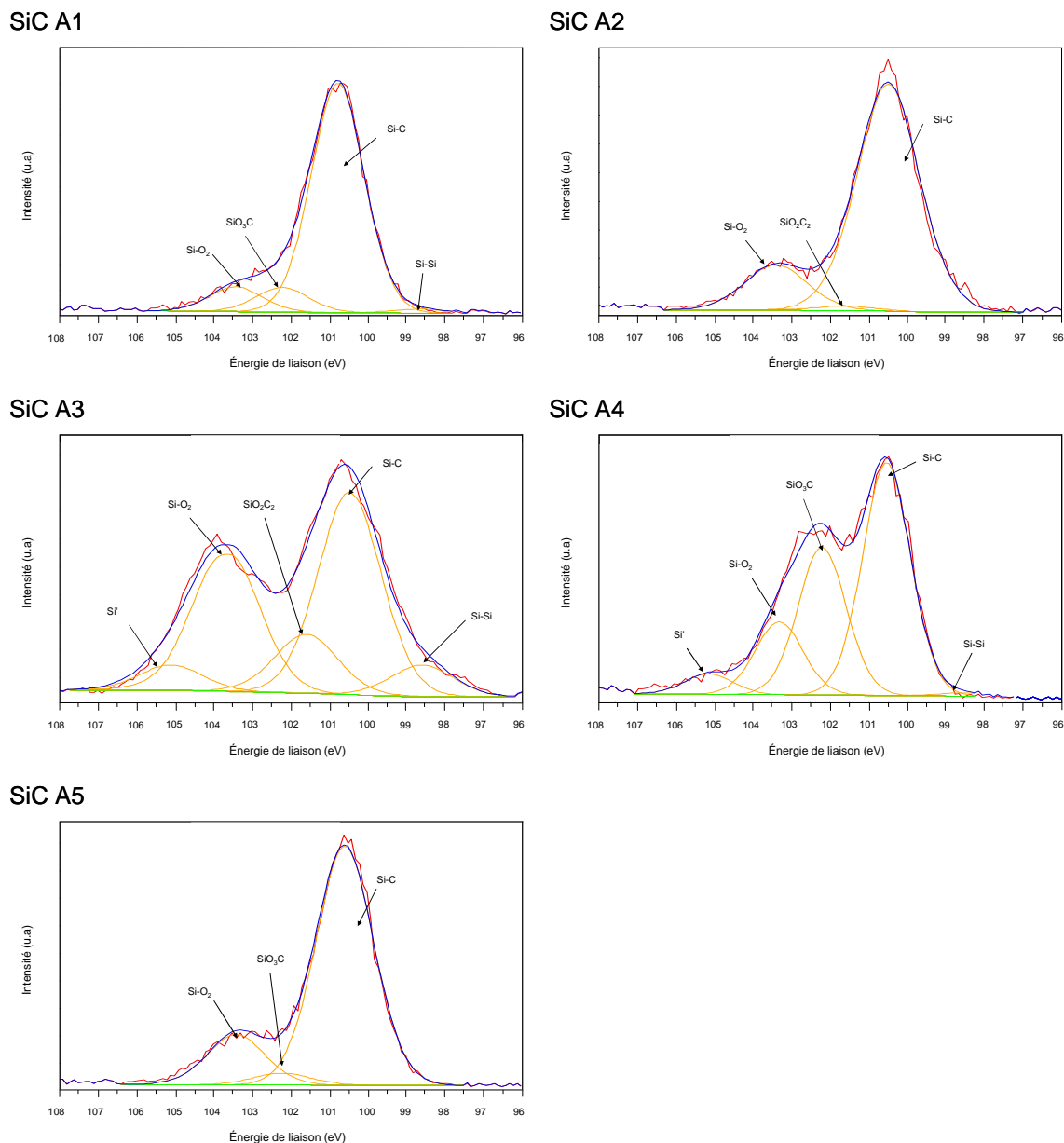
		Nom des échantillons				
		SiC A1	SiC A4	SiC A2	SiC A5	SiC A3
Pourcentage atomique (%)	Si <sub>2p</sub>	45	43	44	43	18
	C <sub>1s</sub>	38	40	34	34	59
	O <sub>1s</sub>	17	17	22	23	23
Principale composition des pics	Si <sub>2p</sub>	Si–C, Si–O <sub>2</sub> , SiO <sub>3</sub> C, SiO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> , Si–Si, Si'				
	C <sub>1s</sub>	C–Si, C–C, Si–O <sub>x</sub> C <sub>y</sub> , C–O, C=O				
	O <sub>1s</sub>	O <sub>2</sub> –Si, Si–O <sub>x</sub> C <sub>y</sub> , O'				

**Tableau 11 : Pourcentage atomique et principale composition de surface des poudres industrielles de SiC**

Le pourcentage atomique d'oxygène de surface est relativement élevé pour l'ensemble des poudres industrielles (%O ≈ 17-23%). Pour une même profondeur d'analyse, l'échantillon A3 présente un excès de carbone et un appauvrissement en silicium (%C ≈ 59% et %Si ≈ 18%). L'ensemble des spectres possède une allure générale commune. L'environnement chimique des éléments détectés souligne principalement la présence de silice (liaison Si–O<sub>2</sub>), d'oxycarbure de silicium (liaison Si–O<sub>x</sub>C<sub>y</sub>), de carbone (liaison C–C), de certaines formes oxydées (liaisons C–O, C=O) et des traces de silicium (liaison Si–Si).

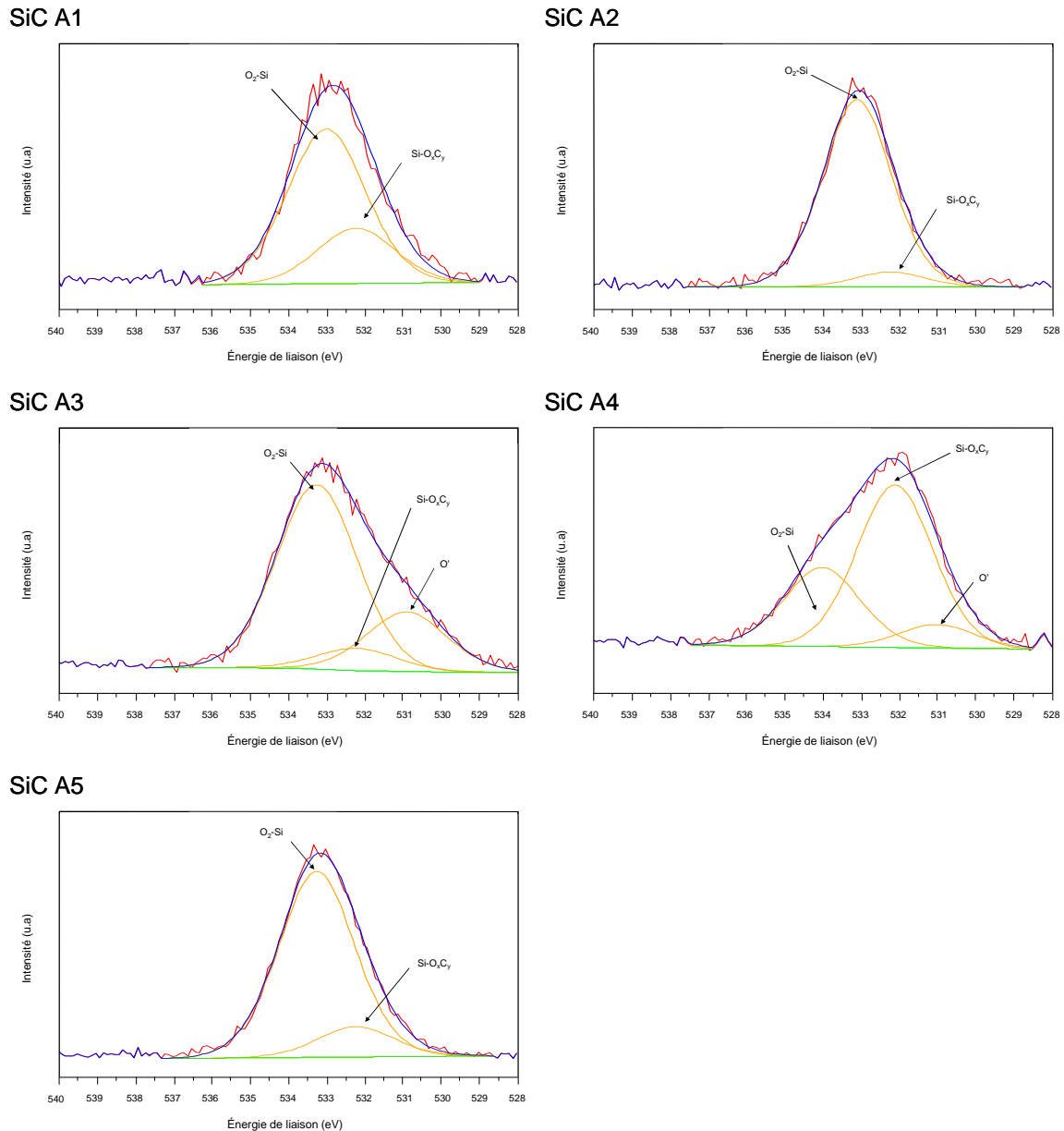
La silice (liaison Si–O<sub>2</sub>) est nettement présente dans l'ensemble des poudres (Figure 54 et Figure 55). On note également une part non négligeable d'oxydes mixtes SiO<sub>x</sub>C<sub>y</sub>, en proportion significative dans la poudre A4 (Figure 54) qui contraste singulièrement avec les autres échantillons (A1, A2 et A5). De manière générale, la phase d'oxycarbure de silicium est une phase métastable dans laquelle les atomes de silicium sont liés simultanément à des atomes de carbone et d'oxygène. Selon certaines études (Qi et al., 1993 ; Önnby et Pantano,

1997 ; Hijikata et al., 2001 ; George et al., 2002), quelques phases stœchiométriques ont pu être observées comme:  $[\text{SiOC}_3]$  ( $E_1 = 100,2\text{-}100,6$  eV),  $[\text{SiO}_2\text{C}_2]$  ( $E_1 = 101,2\text{-}101,8$  eV) et  $[\text{SiO}_3\text{C}]$  ( $E_1 = 102,1\text{-}102,6$  eV). Ces oxydes mixtes peuvent également être mis sous la forme  $\text{SiC}_{4-x}\text{O}_2$  avec  $x \leq 2$  (Hornetz et al., 1985). On peut noter la présence d'un faible pic noté (Si') vers 105 eV difficilement identifiable et présent dans les poudres A3 et A4. Ce pic pourrait correspondre à des impuretés telles que de la fumée de silice (Chenhall et al., 1985) ou des groupements  $\text{Si}-\text{C}_x\text{H}_y$  (Wagner et al., 1979).



**Figure 54 : Décomposition des spectres de photoémission du niveau de cœur  $\text{Si}_{2p}$  observés par analyse de la surface des poudres industrielles de SiC**

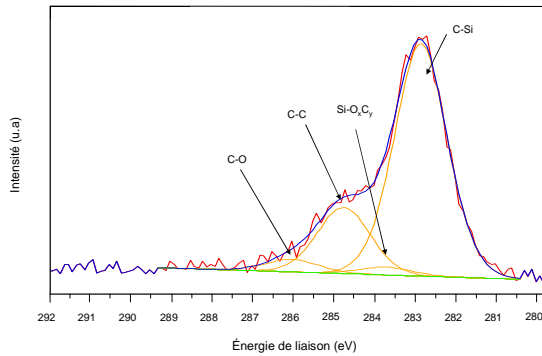
De la même façon, un pic noté (O') peut également être observé vers les faibles énergies ( $\approx 531$  eV) principalement pour les poudres A3 et A4. Bien qu'il soit difficile d'en identifier clairement l'origine, il est possible d'attribuer sa présence à la liaison O=C (Weng et al., 1995 ; Delpoux et al., 1998), à différents modèles structuraux du type « pont » (C–O–C, Si–O–Si) ou à l'insertion d'atome d'oxygène dans la liaison Si–C (Si–O–C) (Hijikata et al., 2001 ; Shimoda et al., 2007).



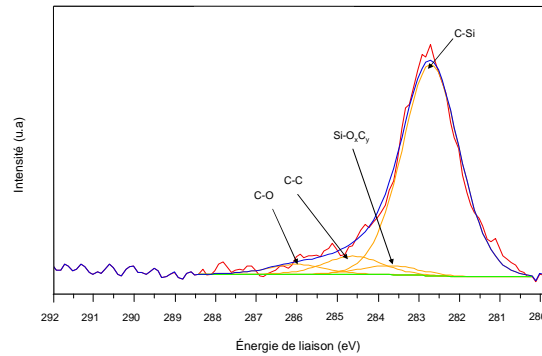
**Figure 55 : Décomposition des spectres de photoémission du niveau de cœur  $O_{1s}$  observés par analyse de la surface des poudres industrielles de SiC**

La composante attribuée à la liaison C–C (Figure 56) est en général la signature d’une contamination résiduelle de surface provoquée par la pollution atmosphérique ; néanmoins, à en juger par la forme des pics  $C_{1s}$  pour les différentes poudres, en particulier A3 ( $\%C_{\text{libre}} \approx 17\%$ ), on ne peut exclure la contribution relative du carbone libre contenu dans les échantillons.

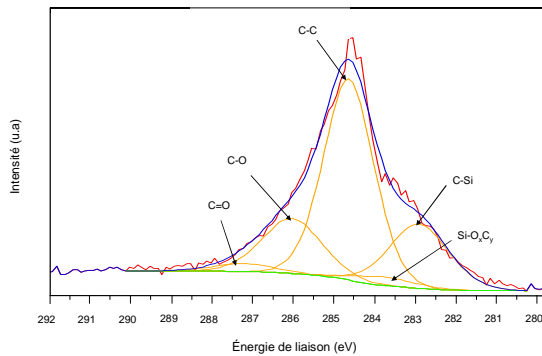
SiC A1



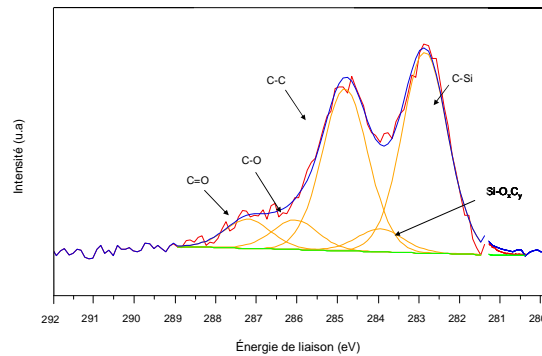
SiC A2



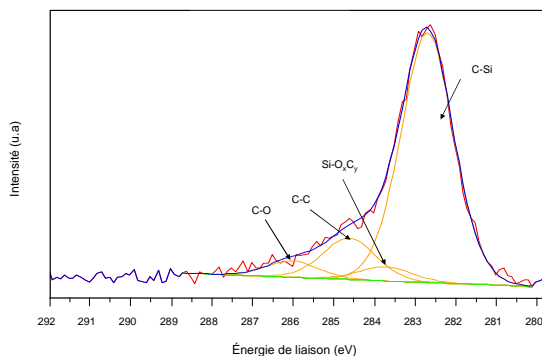
SiC A3



SiC A4



SiC A5



**Figure 56 : Décomposition des spectres de photoémission du niveau de cœur  $C_{1s}$ , observés par analyse de la surface des poudres industrielles de SiC**

La présence de formes oxydées en surface de toutes ces poudres (liaisons C–O et C=O) (Jensen et al., 2005 ; Novak et al., 2007) est à relier vraisemblablement avec l’histoire



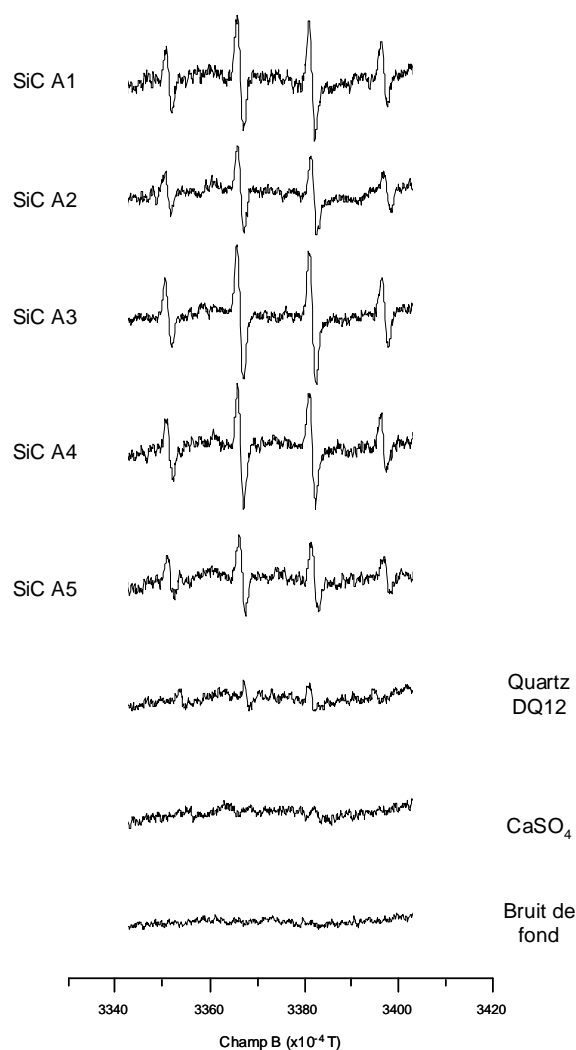
industrielle de ce type de poudre. On rappelle en effet que cette méthode de synthèse nécessite l'emploi de réactifs impurs (silice et coke pétrolier) et de très nombreuses opérations (concassage, broyage, ...) pouvant expliquer l'impureté de surface de ces particules.

Enfin, ces particules semblent être constituées de grains de SiC recouverts par une couche de silice (liaison Si-O<sub>2</sub>) avec une zone intermédiaire d'oxycarbure de silicium (liaison Si-O<sub>x</sub>C<sub>y</sub>). Elles présentent des impuretés résiduelles de carbone de pollution et/ou de carbone libre (liaison C-C), en quantité nettement plus importante pour A3. On observe également d'autres impuretés : du silicium (Si-Si) et des formes oxydées (C-O, C=O), caractéristiques de ces particules industrielles de SiC issues du procédé Acheson.

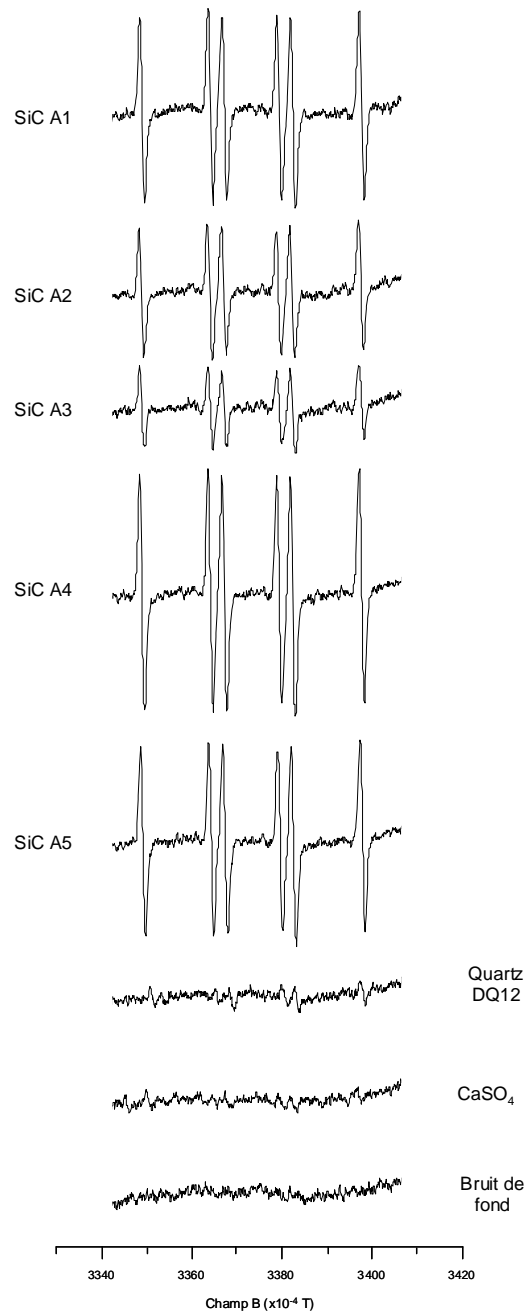
### 2.3. Activité radicalaire : HO•, COO•<sup>-</sup>

Ces expériences en milieu acellulaire permettent de mettre en évidence la capacité des particules de SiC à participer à la génération de radicaux libres (HO•, COO•<sup>-</sup>). Ceci traduit la capacité propre des poudres de SiC à réagir respectivement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour former des radicaux HO• et les groupements C-H (communs à de nombreuses molécules présentes dans le milieu biologique) pour entraîner la formation du radical COO•<sup>-</sup>.

Les résultats obtenus soulignent une capacité importante de l'ensemble des particules industrielles à générer des radicaux libres HO• (Figure 57) et COO•<sup>-</sup> (Figure 58).



**Figure 57 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-OH]• obtenus en présence des poudres industrielles de SiC. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres HO• générés**

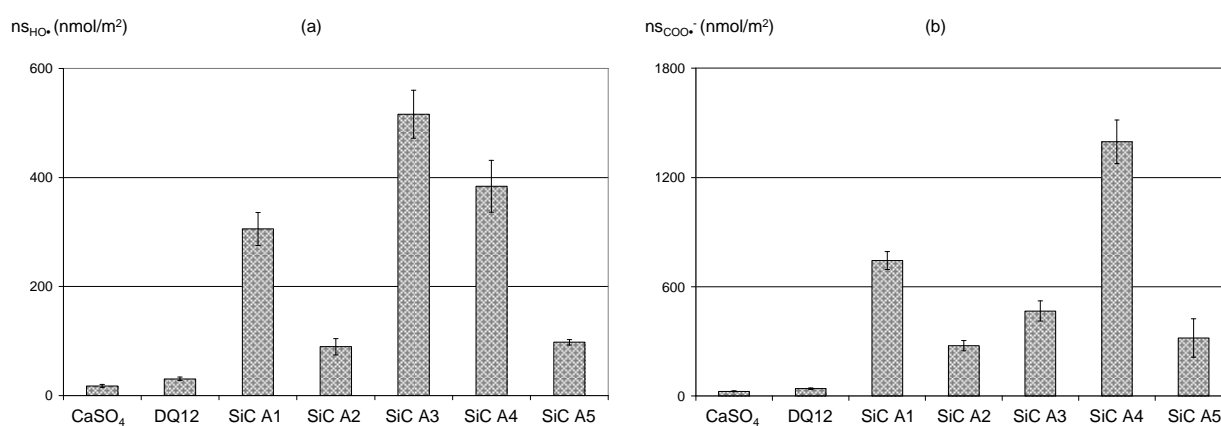


**Figure 58 : Signaux RPE de l'adduit  $[\text{DMPO-COO}]^\bullet$  obtenus en présence des poudres industrielles de SiC. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres  $\text{COO}^\bullet$  générés**

Pour les deux tests, les signaux relatifs aux particules industrielles sont très explicites et contrastent très nettement avec le signal du bruit de fond, soulignant l'activité radicalaire ( $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{COO}^\bullet$ ) très importante des particules de SiC. Nous avons également analysé les

témoins positif (quartz DQ12) et négatif ( $\text{CaSO}_4$ ) de toxicité qui présentent, dans les mêmes conditions, respectivement des signaux à peine détectables, voire dans le bruit de fond.

L'utilisation d'un étalon interne (Mn) permet d'accéder à la quantité de radicaux ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ) générés dans le milieu réactionnel. Par ailleurs, l'activité radicalaire étant un phénomène de surface, nous avons normalisé les résultats par rapport à ce paramètre. Ainsi, nous obtenons pour chaque poudre, l'activité radicalaire par unité de surface (Figure 59).



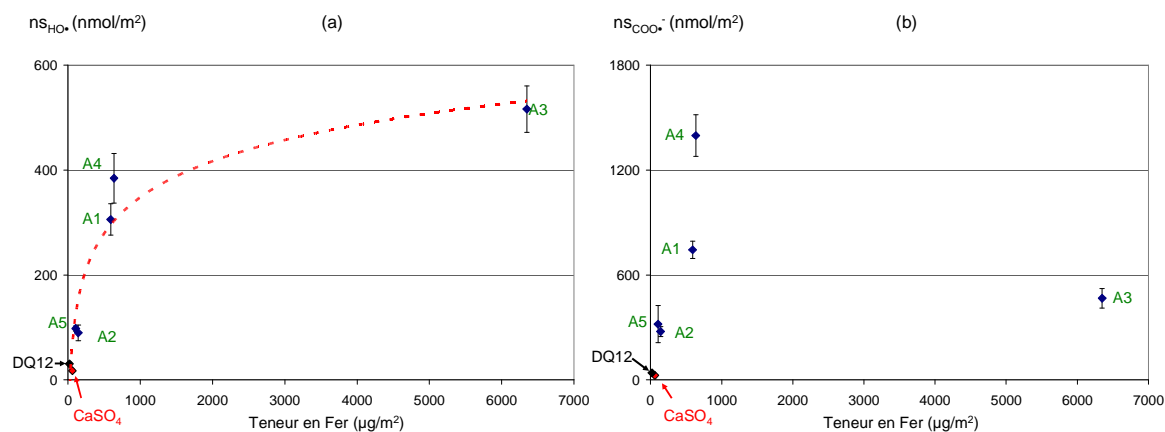
**Figure 59 : Activité radicalaire des particules industrielles de SiC en milieu acellulaire pour la génération des radicaux (a)  $\text{HO}\cdot$  et (b)  $\text{COO}\cdot^-$**

Sur l'ensemble des deux tests, l'activité radicalaire des témoins négatif et positif de toxicité indique des valeurs faibles ( $n_{\text{HO}\cdot} \approx n_{\text{COO}\cdot^-} \leq 40 \text{ nmol/m}^2$ ). Des différences sont observées entre les particules industrielles. L'activité radicalaire par unité de surface est :

- très importante pour les particules A1 et A4, avec des valeurs voisines pour  $\text{HO}\cdot$  ( $350 \text{ nmol/m}^2$ ) et un écart plus conséquent pour les radicaux  $\text{COO}\cdot^-$  ( $750$  et  $1400 \text{ nmol/m}^2$ ).
- significative pour les particules A2 et A5, avec des densités de radicaux libres voisines pour les 2 espèces radicalaires ( $n_{\text{HO}\cdot} \approx 100 \text{ nmol/m}^2$  et  $n_{\text{COO}\cdot^-} \approx 300 \text{ nmol/m}^2$ ).

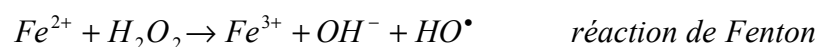
Pour la poudre A3, riche en impuretés, l'activité est comparable aux poudres A1 et A4 avec des valeurs respectivement plus élevées pour le radical hydroxyle ( $500 \text{ nmol/m}^2$ ) et moins importante pour le radical carboxyle ( $500 \text{ nmol/m}^2$ ).

Les mécanismes impliqués dans la génération des radicaux libres sont à ce jour loin d'être compris. Une hypothèse souvent évoquée est la présence d'impuretés métalliques en surface des particules (Chap II, 4.2.3). Par conséquent, nous avons cherché des corrélations entre nos résultats et les principales impuretés métalliques contenues dans les particules industrielles de SiC. Il semble que le fer\* soit impliqué, pour une part, dans les mécanismes de génération des radicaux HO• (Figure 60).



**Figure 60 : Influence des impuretés métalliques de fer contenues dans les particules industrielles de SiC sur l'activité radicalaire (a) HO• et (b) COO•**

Ces observations sont en accord avec différents travaux réalisés sur des particules minérales (Fubini, 2007). En effet, le fer agit vraisemblablement via des mécanismes de réaction en chaîne comme ceux décrits par Fubini (Fubini et Mollo, 1995 ; Fubini et Hubbard, 2003) et observés avec des fibres minérales et des poudres de silice :

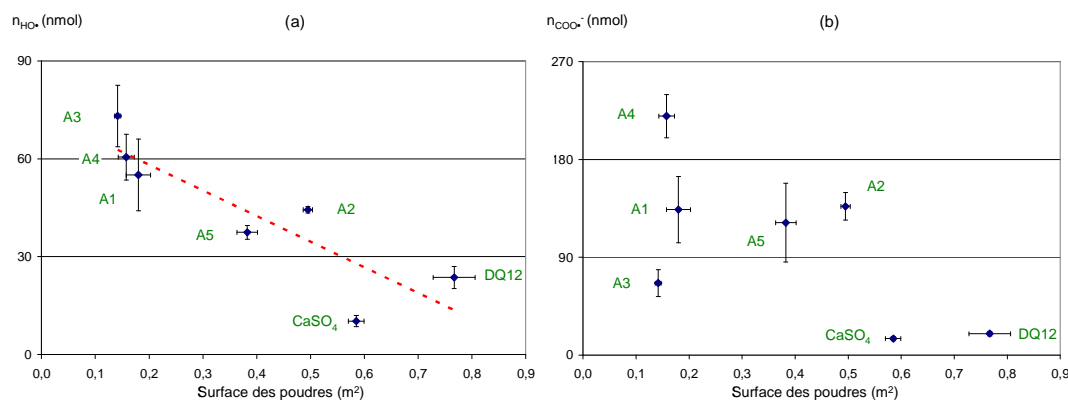


La combinaison entre  $H_2O_2$  et  $Fe^{2+}$  (dits "réactifs de Fenton") constitue un puissant oxydant pour une grande variété de substrats organiques (Benitez et al., 2001 ; De Heredia et al., 2001) justifié principalement par l'extrême réactivité du radical hydroxyle (Haber et Weiss, 1934). Cette réaction n'en demeure pas moins complexe avec des réactions secondaires mettant en jeu les réactifs et les produits (Stuglik et Zagorski, 1981 ; Buxton et al., 1988 ; Gallard et al., 1998 ; Kiwi et al., 2000). Ainsi, il reste très difficile de corréler ces observations à un

\* Remarque : à défaut de ne pouvoir connaître la proportion de fer en surface de nos particules, on prendra la valeur correspondant au fer total contenu dans les poudres industrielles de SiC dosé par analyse chimique (ICP).

mécanisme réactionnel unique. Il est en effet fort probable que d'autres paramètres (morphologie, structure cristalline, impuretés, etc.) soient impliqués dans ce type de mécanisme comme semble le justifier les différences observées entre  $\text{HO}\cdot$  et  $\text{COO}\cdot^-$ .

En prenant en compte la surface des particules (Figure 61), on observe, essentiellement pour le radical  $\text{HO}\cdot$ , une possible diminution de l'activité radicalaire en fonction de la surface.



**Figure 61 : Influence de la surface des particules industrielles de SiC sur l'activité radicalaire (a)  $\text{HO}\cdot$  et (b)  $\text{COO}\cdot^-$**

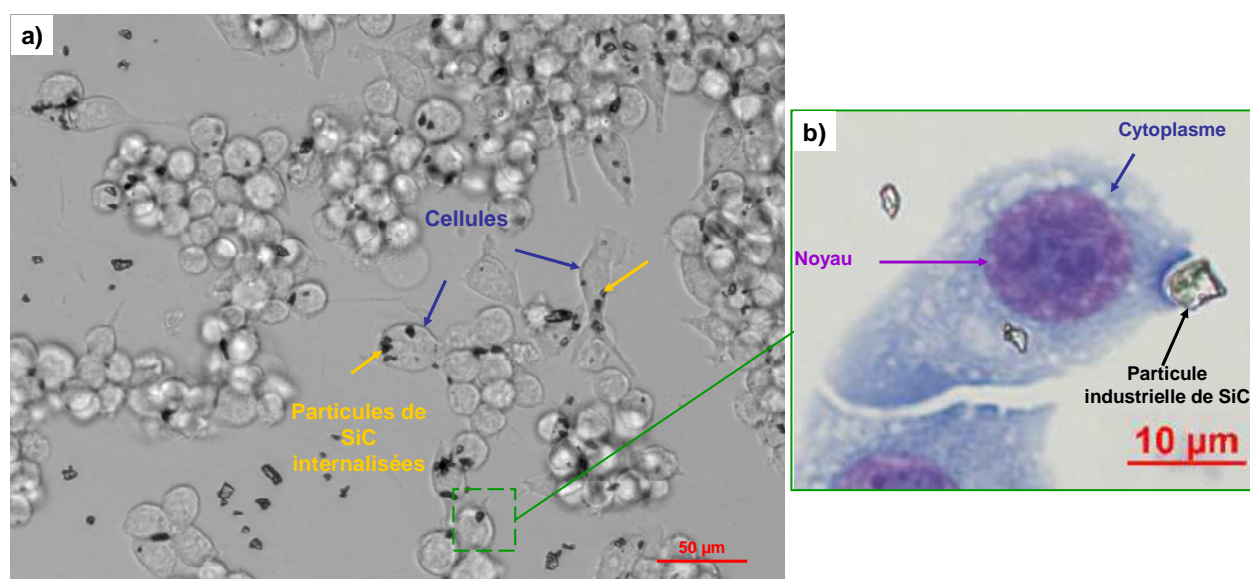
Ce paradoxe entre l'évolution de l'activité radicalaire et la surface des poudres peut mettre en avant l'hypothèse de l'implication du paramètre morphologique. En effet, les poudres A1, A4 et A3 sont constituées de gros grains avec des morphologies très spécifiques dont les caractéristiques s'amenuisent lorsque la taille diminue (poudres A2 et A5) (Chap IV, 2.1.1). Cependant, bien que l'on puisse fournir des indications sur l'influence de certains paramètres, il semble très prématuré de tirer des conclusions claires.

Ainsi, par transposition au milieu biologique, les particules une fois inhalées et déposées dans le poumon profond, vont pouvoir fortement réagir avec les produits sécrétés par les macrophages ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et les protéines du milieu biologique (groupements C-H) en générant des radicaux libres d'une extrême réactivité, créant ainsi des dommages cellulaires et tissulaires (Chap II, 3.3). Les impuretés métalliques (Fe) ainsi que la surface et/ou la morphologie des particules jouent probablement un rôle dans les mécanismes de génération des radicaux libres mais un travail de fond est nécessaire pour mieux comprendre et interpréter ces mécanismes.

### 3. Activité biologique

Dans ce qui précède, l'ensemble des particules, susceptible de pénétrer par inhalation dans les alvéoles pulmonaires et d'interagir avec les macrophages alvéolaires, a été caractérisé afin d'en déterminer les principales caractéristiques physico-chimiques.

Cette interaction entre les particules et les macrophages est caractérisée par la phagocytose (Figure 18). Au cours de l'étude sur l'activité biologique, nous avons observé cette interaction par microscopie optique directement au fond des puits de culture (Figure 62).



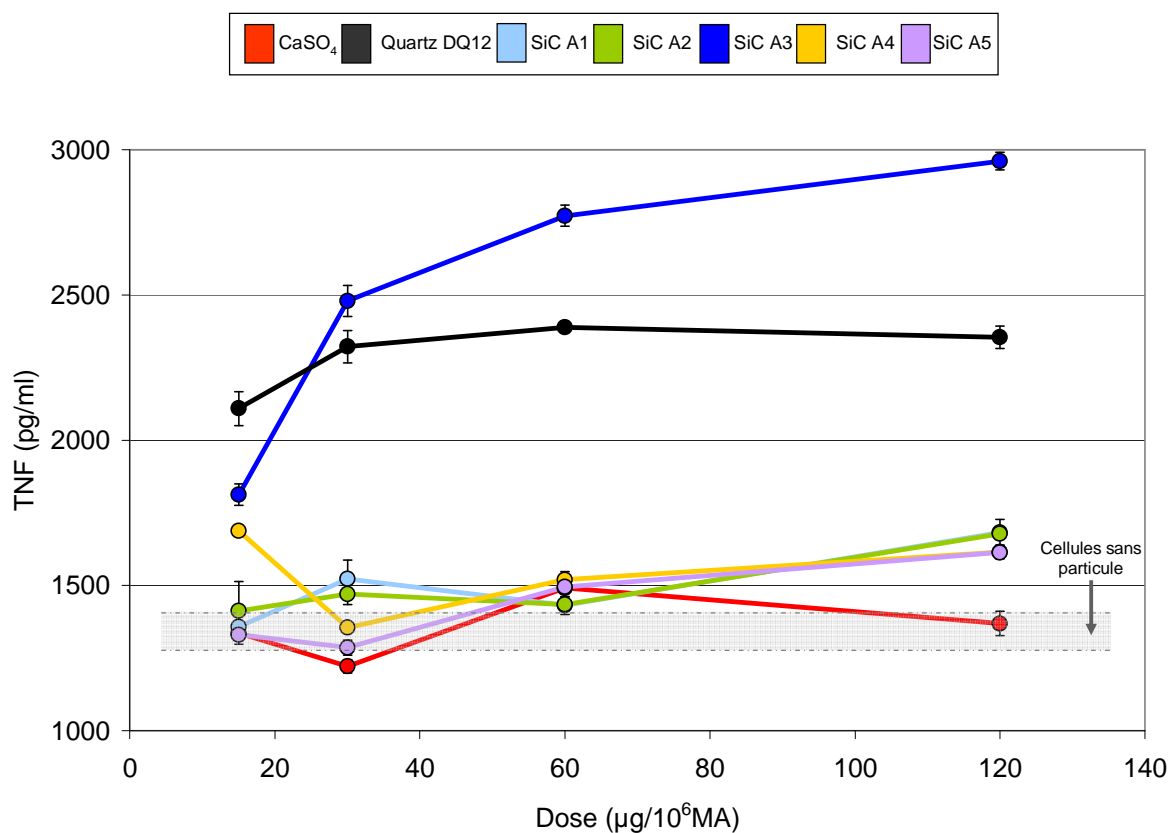
**Figure 62 : Images en microscopie optique (*Olympus, IX2-UCB*). (a) Aspect du fond d'un puits de culture après 24h de contact entre les macrophages (RAW 264.7) et les particules industrielles - visualisation de particules industrielles internalisées par les macrophages. (b) Observation d'une particule en cours d'internalisation par un macrophage après une coloration sur lame au MGG (May-Grunwald Giemsa).**

Conformément à l'étude bibliographique, la méthodologie de travail consiste à suivre l'évolution de l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ), de l'endommagement et la mort cellulaire (LDH) et du stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les résultats obtenus sur les macrophages nous permettront d'établir un modèle vecteur permettant de visualiser l'évolution de l'activité biologique globale de chaque particule industrielle de SiC par rapport à des témoins négatif (CaSO<sub>4</sub>) et positif (quartz DQ12) de toxicité. Les mesures sont toujours réalisées en duplicat, au minimum deux fois. Dans ces conditions, elles indiquent ainsi une tendance générale fiable.

### 3.1. Etat d'inflammation : TNF- $\alpha$

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre précédent, le TNF- $\alpha$  est une cytokine produite et sécrétée par les cellules dans le milieu extracellulaire au cours de la réaction inflammatoire. Elle constitue un indicateur du niveau de l'état d'inflammation provoqué par les particules de SiC sur les macrophages.

A l'exception de la poudre A3, qui présente un signal très élevé, les résultats pour ce paramètre indiquent une activité biologique modérée pour l'ensemble des particules (Figure 63).



**Figure 63 : Etat d'inflammation (TNF- $\alpha$ ) des macrophages alvéolaires après 24h de contact avec les particules de SiC**

Ces résultats sont reproductibles avec des niveaux d'activité biologique proches pour les poudres A1, A2, A4 et A5. Seul, l'indicateur de l'atmosphère de travail (A3), dont le signal est bien supérieur à celui du témoin positif de toxicité, semble souligner que les impuretés contenues dans cette poudre (silice cristalline et carbone, Tableau 9) amplifient le signal propre des particules de SiC. L'expression des résultats en fonction de la surface des



particules (cf. Annexe F) ne met pas en évidence l'implication de ce paramètre dans la réponse cellulaire (Chap II, 4.1.3). Celle-ci ne semble donc pas être surface-dépendante pour la cytokine pro-inflammatoire étudiée (TNF- $\alpha$ ).

### 3.2. Endommagement et mort cellulaire : LDH

La LDH (Lactate Déshydrogénase) est une enzyme présente dans le cytoplasme des cellules vivantes. En cas d'endommagement ou de mort cellulaire, la LDH est relarguée dans le milieu extracellulaire. Témoin de la mort cellulaire, cette espèce peut être dosée afin d'évaluer la cytotoxicité des particules de SiC. Les résultats (Figure 64) indiquent une activité nulle des particules industrielles sur la mort cellulaire.

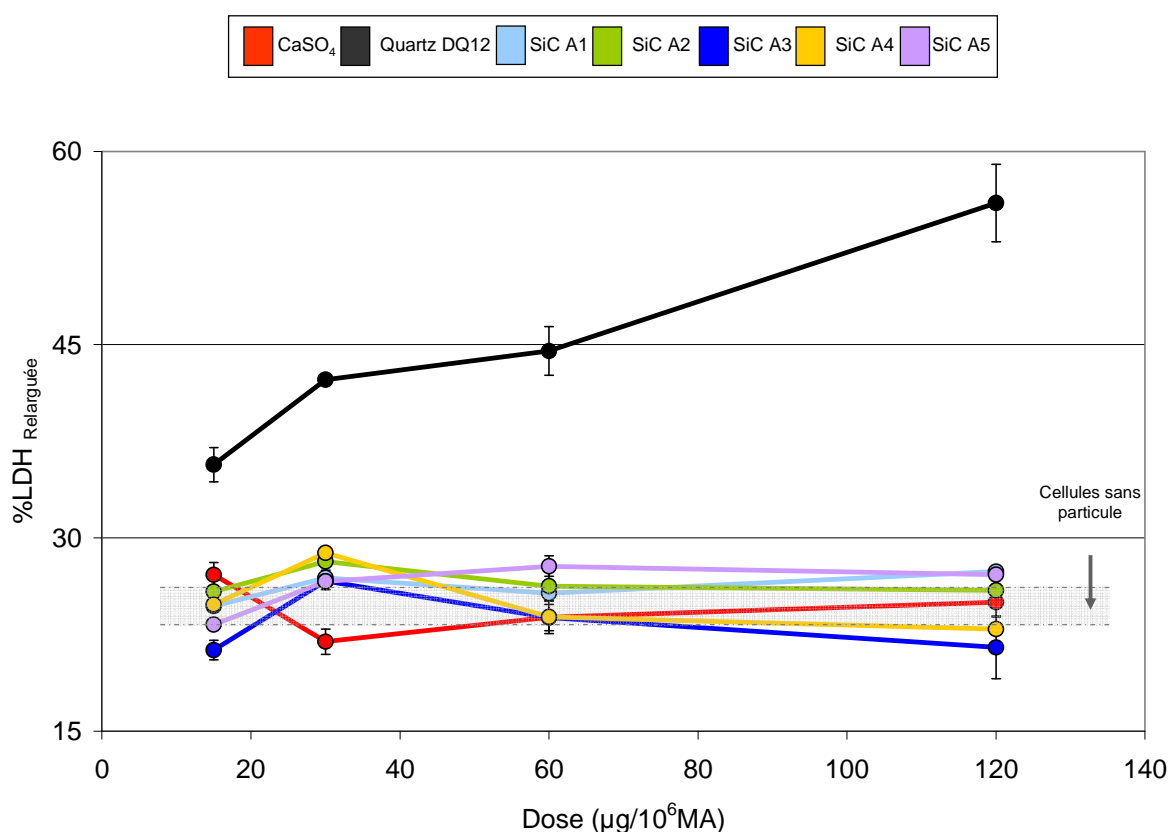


Figure 64 : Endommagement et mort cellulaire (LDH) après 24h de contact avec les particules de SiC

L'ensemble des valeurs se situe au niveau du témoin négatif de toxicité et des cellules sans particule ( $\%LDH_{Relarguée} \leq 30\%$ ), bien en dessous du témoin positif de toxicité ( $\%LDH_{Relarguée} \approx 50\%$ ). Ce résultat reproductible prouve que les particules industrielles ne sont pas cytotoxiques. De la même façon que précédemment, les résultats exprimés en

fonction de la surface des particules ne soulignent pas l'implication de ce paramètre dans la mort cellulaire (cf. Annexe F).

### 3.3. Stress oxydant : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), principal agent du pouvoir oxydant des cellules, est un acteur central du stress oxydant. Le dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en milieu extracellulaire a pour but d'évaluer le stress cellulaire provoqué par les particules de SiC sur les macrophages.

Sur l'ensemble des deux tests, on peut remarquer que le témoin positif (quartz DQ12) semble moins actif, en accord avec les résultats précédemment observés avec les poudres de silice (Bruch et al., 2004). Il en résulte une différence moins importante entre les témoins positif et négatif de toxicité mais qui ne nuit en rien à l'interprétation des résultats.

➤ *Stress oxydant aigu (ROS)* : Après une interaction cellule/particule de 90 minutes, les résultats obtenus (Figure 65) indiquent une activité biologique dont l'intensité varie selon la nature des particules.

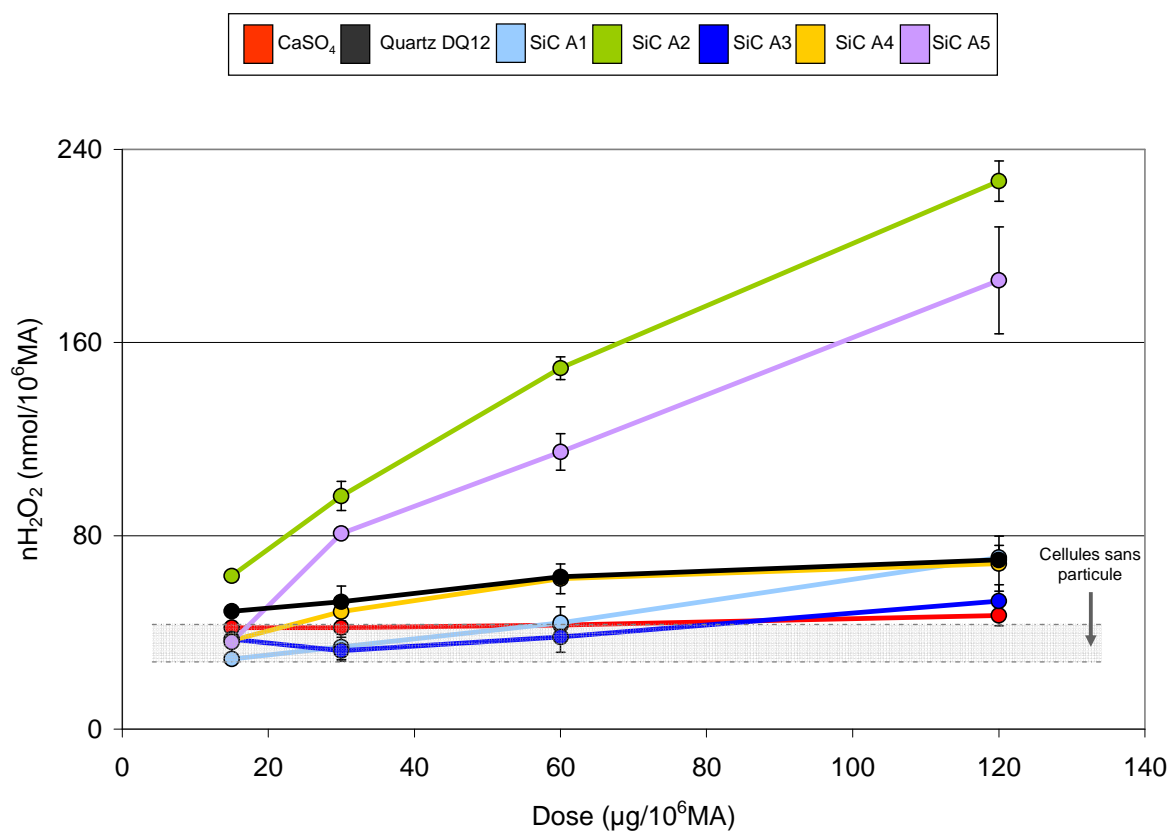


Figure 65 : Stress oxydant aigu (ROS) des macrophages après 24h de contact avec les particules de SiC

Le stress oxydant à court terme est modéré pour les poudres de SiC A1 et A4 avec des valeurs voisines de celles du témoin positif ( $\approx 70 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ ). Le signal devient très significatif pour les particules de SiC A2 et A5 atteignant des valeurs importantes en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de l'ordre de  $200 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ . La poudre A3 est peu active restant au niveau du témoin négatif de toxicité ( $\approx 50 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ ). Ainsi, dans les premiers instants de l'interaction macrophage/particule, les cellules présentent un début de stress oxydant modéré pour l'ensemble des poudres avec des valeurs très significatives pour les poudres A2 et A5.

- *Stress oxydant chronique (TOX)* : Après une interaction cellule/particule de 24 heures, l'activité biologique des particules devient très significative pour l'ensemble des particules (Figure 66). On rappelle que les résultats en absorbance sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin positif de toxicité, le quartz DQ12 (Bruch et al., 2004).

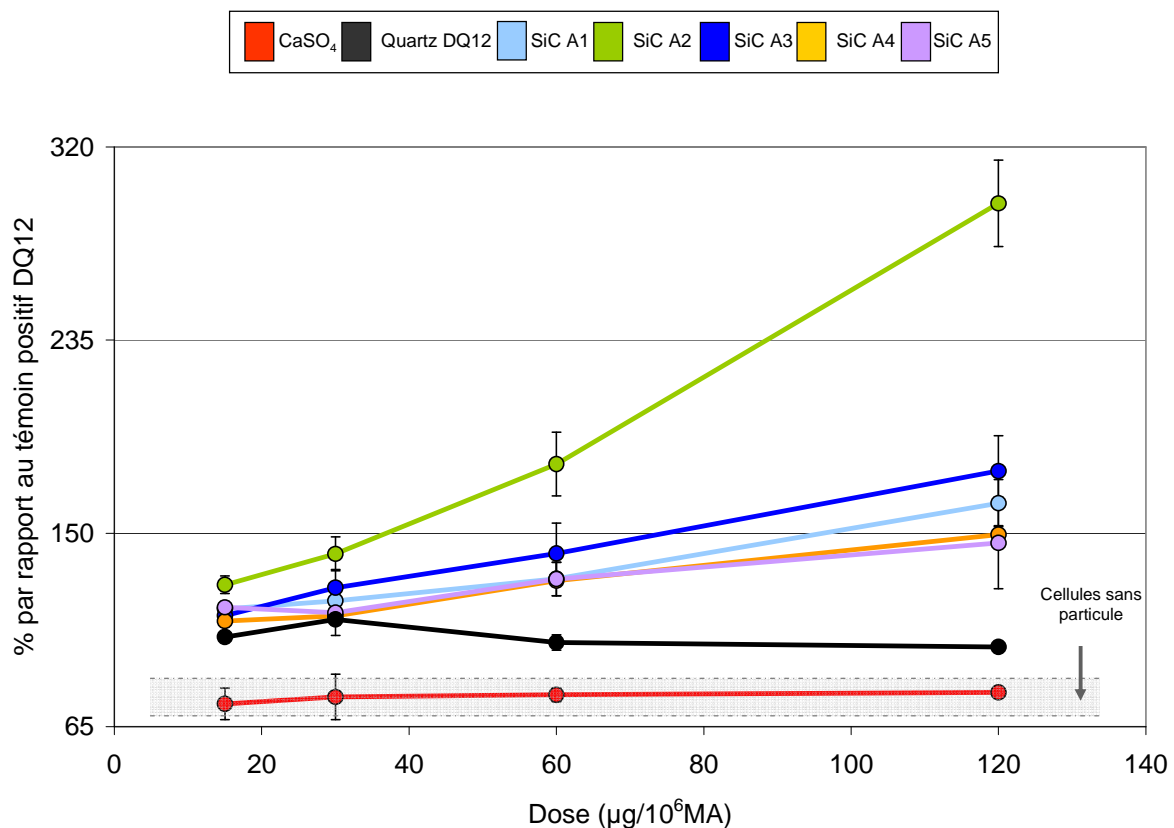
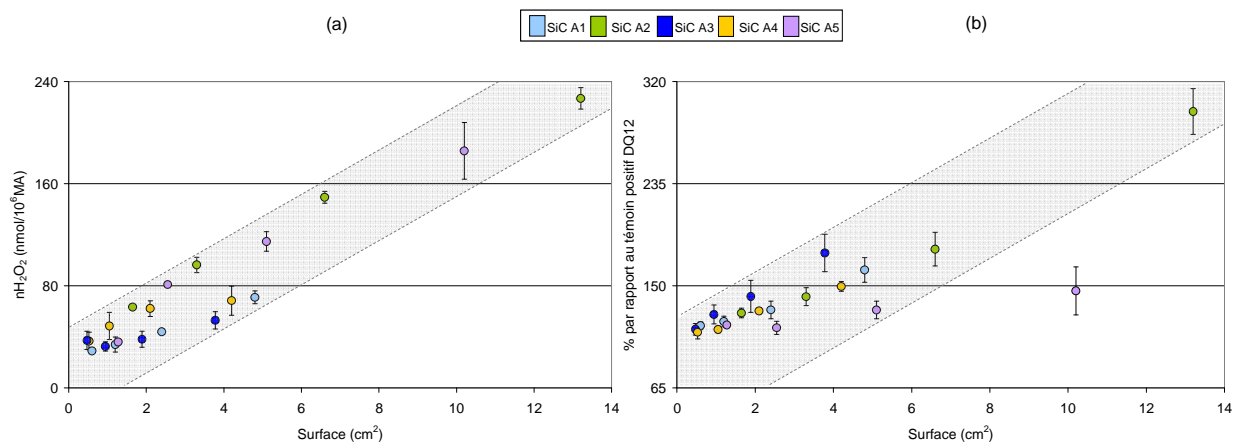


Figure 66 : Stress oxydant chronique (TOX) des macrophages après 24h de contact avec les particules de SiC

On observe un niveau de stress oxydant très significatif pour la poudre A2 ( $\approx 300\%$ ) en comparaison de A1, A3, A4 et A5 qui ont une activité significative ( $\approx 150\%$ ) bien au-dessus des témoins positif (=  $100\%$ ) et négatif de toxicité ( $\approx 80\%$ ). Ces valeurs permettent de mettre en évidence l'augmentation générale du stress oxydant lorsque le temps d'interaction particule/cellule augmente, à l'image de ce qui arrive quand les particules inhalées atteignent et se déposent dans les alvéoles pulmonaires (Chap II, 2.2).

Ainsi, à long terme dans l'organisme, l'ensemble des particules étudiées va provoquer un stress oxydant très significatif sur les cellules.

On note, pour l'ensemble de ces données (ROS et TOX), des réponses doses dépendantes évidentes. Ces résultats convertis en surface semblent cette fois-ci mettre en évidence l'implication de la surface d'exposition des particules (Figure 67).



**Figure 67 : Influence de la surface des particules sur le stress oxydant (a) aigu et (b) chronique**

Quelque soit la durée de contact cellule/particule, l'ensemble des données relatives aux particules industrielles semble indiquer la même tendance corroborant ainsi l'hypothèse que la surface des particules de SiC représente un paramètre clé pour le stress oxydant.

**Conclusion :**

L'interaction cellule/particule est caractérisée par la phagocytose des particules de SiC et l'activation des macrophages au niveau cellulaire et moléculaire. L'étude des domaines de l'inflammation (TNF- $\alpha$ ), de la mort cellulaire (LDH) et du stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nous permet d'estimer l'activité biologique des particules sur les cellules. Ainsi, l'étude de la réponse cellulaire souligne, pour les particules industrielles de SiC (A1, A2, A4 et A5), une activité modérée sur l'état d'inflammation, nulle sur la mort cellulaire et significative sur le stress oxydant.

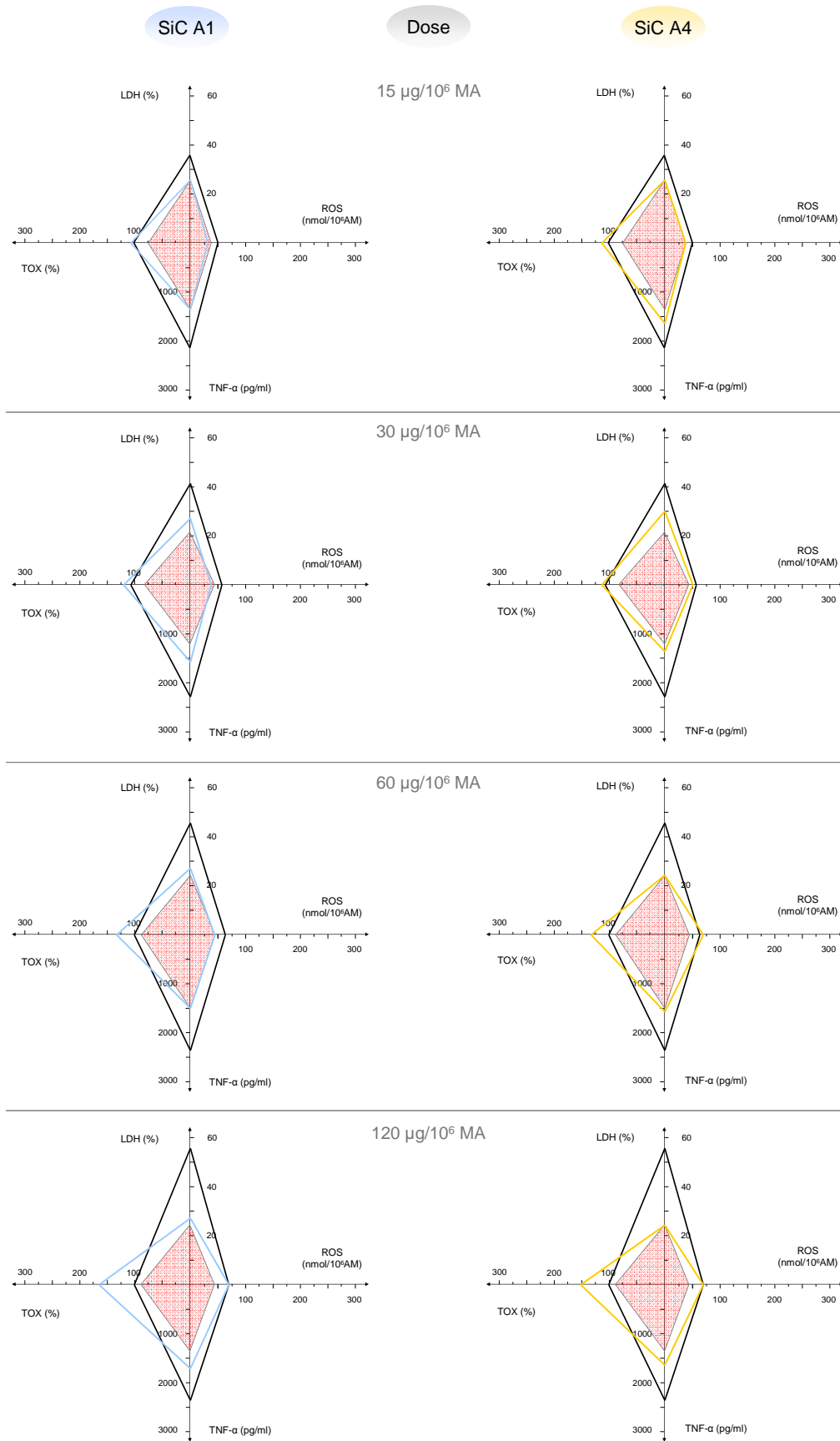
La poudre A3 présente, en plus des autres particules, une activité inflammatoire nettement plus marquée comparable voire supérieure à celle des particules de silice (IARC, 1997).

**3.4. Evolution globale de l'activité biologique**

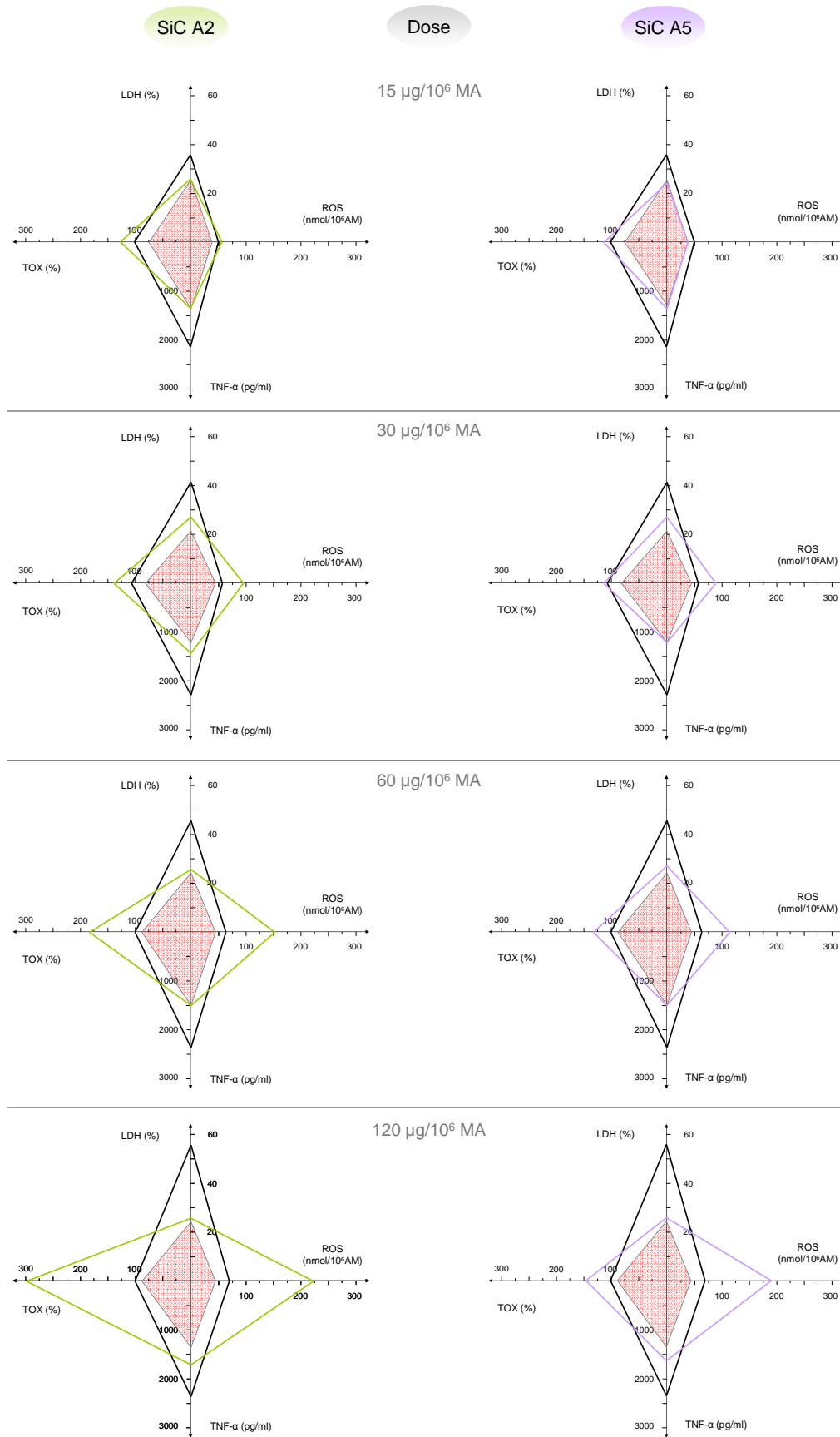
Après avoir étudié individuellement des domaines distincts de l'activité biologique, nous pouvons exprimer les résultats selon un modèle vecteur qui consiste à porter sur les 4 axes les paramètres des domaines de l'activité biologique étudiés en milieu cellulaire :

- le TNF- $\alpha$  pour l'état l'inflammation,
- la LDH pour l'endommagement et mort cellulaire,
- le ROS et le TOX respectivement pour le stress oxydant aigu et chronique par dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

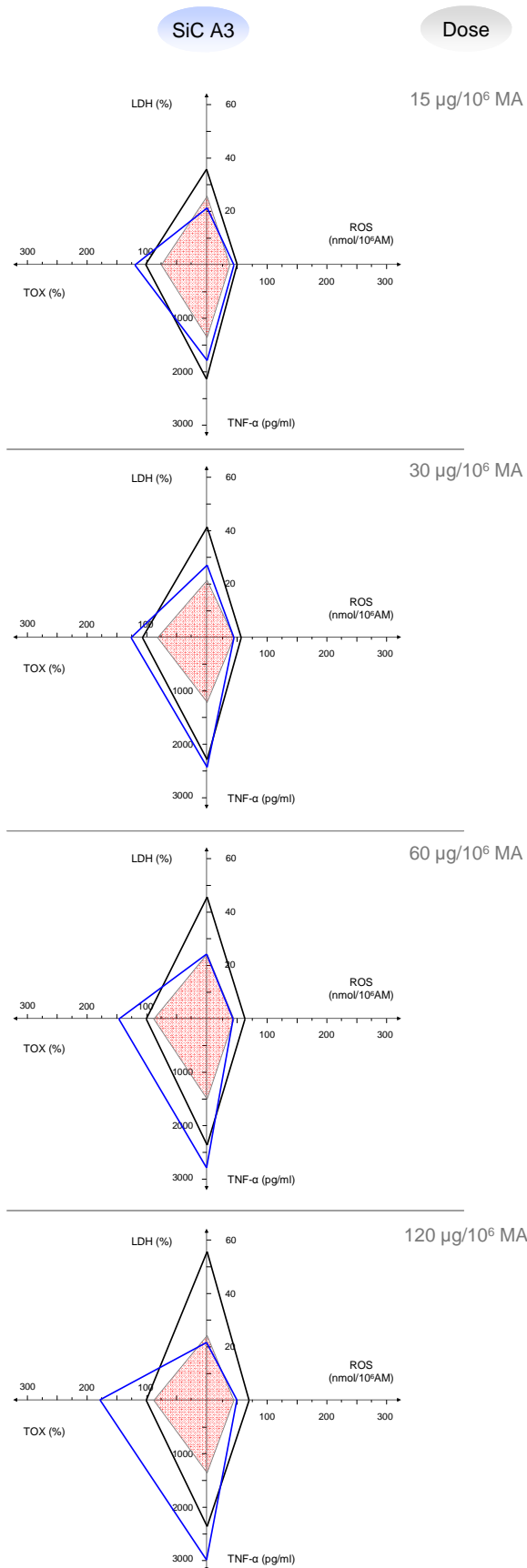
L'objectif est d'avoir une idée de l'activité biologique globale des particules de SiC (Figure 68, Figure 69, Figure 70) et de comparer les particules étudiées.



**Figure 68 : Evolution de l'activité biologique globale de particules industrielles de SiC A1 et A4 par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport aux témoins négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**



**Figure 69 : Evolution de l'activité biologique globale de particules industrielles de SiC A2 et A5 par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport aux témoins négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**



**Figure 70 : Evolution de l'activité biologique globale de particules industrielles de SiC A3 par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport aux témoins négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**



Les résultats du modèle vecteur montrent clairement des différences dans l'évolution de l'activité biologique globale des particules de SiC A1 et A4 (Figure 68), A2 et A5 (Figure 69) et de l'indicateur de l'atmosphère de travail A3 (Figure 70).

➤ Particules de SiC A1 et A4 (Figure 68) :

Ces particules, destinées aux mêmes types d'applications industrielles (abrasifs, matériaux réfractaires), présentent une activité biologique globale marquée. En effet, l'évolution du quadrilatère se détache nettement de la figure relative au témoin négatif de toxicité et présente les caractéristiques suivantes : une activité inflammatoire modérée avec un signal entre le témoin positif et négatif, une absence de cytotoxicité et un stress oxydant significatif qui se manifeste par l'allongement du quadrilatère sur l'axe horizontal (ROS, TOX).

➤ Particules de SiC A2 et A5 (Figure 69) :

Ces particules, destinées aux mêmes types d'applications industrielles (FAP, céramiques techniques), présentent une activité biologique globale très significative, avec un allongement caractéristique des figures suivant l'axe horizontal du stress oxydant.

➤ Particules de SiC A3 (Figure 70) :

Ces particules ont une activité biologique globale proche de celle des particules A1 et A4. La seule différence est la déformation excessive du quadrilatère suivant le paramètre de l'inflammation (TNF- $\alpha$ ). Ce résultat très atypique est très certainement lié à la présence d'impuretés de silice cristallisée et/ou de particules de carbone qui augmentent la toxicité générale des poudres de SiC pures.

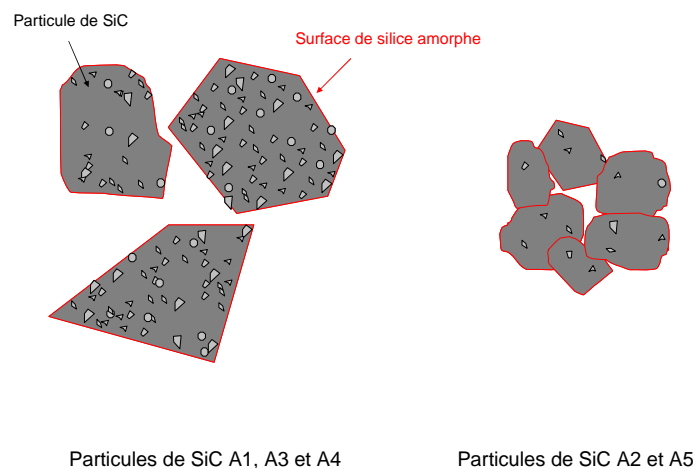
L'étude de l'activité biologique a permis de quantifier l'intensité de la réponse cellulaire de macrophages interagissant avec des particules industrielles de SiC. Il en résulte une activité biologique marquée qui devient très significative pour les fines particules (A2 et A5). Celle-ci augmente considérablement lorsque des impuretés de silice et/ou de carbone sont présentes dans les poudres de SiC.

## 4. Discussion

Pour plus de pertinence et une meilleure lisibilité des résultats, ces derniers sont comparés à ceux obtenus pour les particules de silice dont la toxicité et la réactivité de surface sont connues. Ainsi, notre témoin positif : le quartz DQ12 (IARC, 1997 ; Bruch et al., 2004 ; Fubini et al., 2004) et un échantillon de quartz Min-U-Sil Berkley (IARC, 1997 ; Elias et al., 2000 ; Horwell et al., 2007) ont été testés dans les mêmes conditions expérimentales que les particules de SiC, constituant un outil de comparaison avec les données bibliographiques.

### ➤ *Caractérisation physico-chimique*

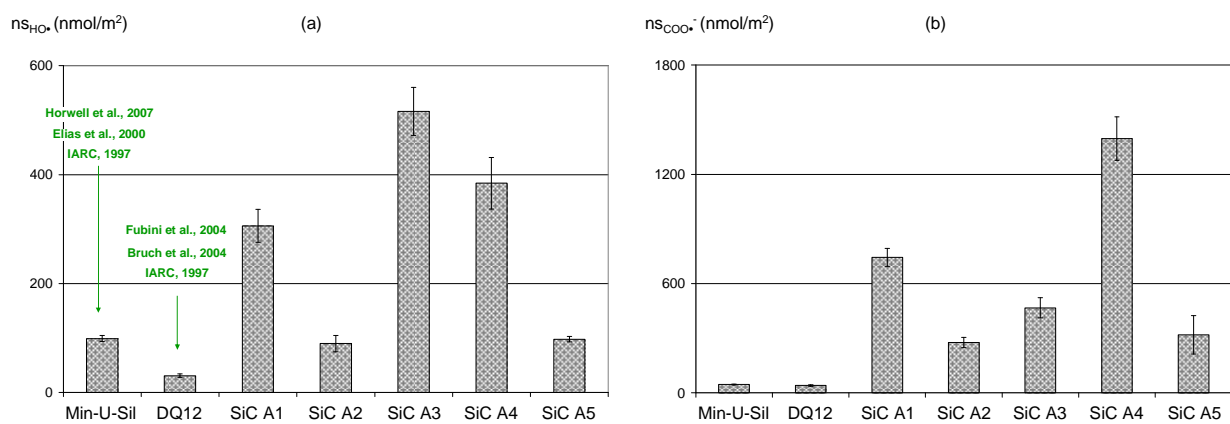
Les particules industrielles de SiC sont polydisperses avec des tailles moyennes différentes : grossières pour les particules A1, A2 et A3 et fines pour les particules A2 et A5. De surface spécifique faible ( $Sp \leq 11 \text{ m}^2/\text{g}$ ), elles se présentent sous forme de gros grains avec une morphologie spécifique caractérisée principalement par la présence de particules nanométriques et submicroniques fixées sur des particules plus larges et un aspect de surface lisse. Ces caractéristiques se font plus rares lorsque la taille des particules diminue (Figure 71).



**Figure 71 : Schéma récapitulatif de l'aspect morphologique des particules industrielles de SiC**

Ces particules de SiC- $\alpha$  peuvent posséder des traces d'impuretés cristallisées (quartz, cristobalite, graphite) et métalliques (Fe, Al). Elles se présentent comme des grains de SiC recouverts par une fine couche de silice (Chap IV, 2.1.1.3) d'épaisseur théorique inférieure à 5 nm, avec pour principales impuretés de surface du carbone (liaisons C-C, C-O, C=O) et du silicium (liaison Si-Si).

- L'étude des radicaux libres prend tout son sens par transposition au milieu biologique. En effet, l'ensemble des particules étudiées (fraction alvéolaire), correspond aux particules susceptibles de pénétrer et de se déposer dans les alvéoles pulmonaires. Localement, celles-ci peuvent réagir de façon aléatoire via les radicaux libres avec les substances environnantes (protéines, enzymes, surfactant, etc.) et les produits sécrétés par les cellules ( $H_2O_2$ , etc.). Au vu des résultats, ceci est particulièrement vérifié pour les particules industrielles de SiC avec des niveaux bien supérieurs à ceux habituellement observés avec les particules de silice les plus actives biologiquement (Figure 72).



**Figure 72 : Etude comparative avec les poudres de silice cristalline de quartz Min-U-Sil et DQ12 (IARC, 1997) pour la génération de radicaux libres (a)  $HO\bullet$  (b)  $COO\bullet-$  en milieu acellulaire**

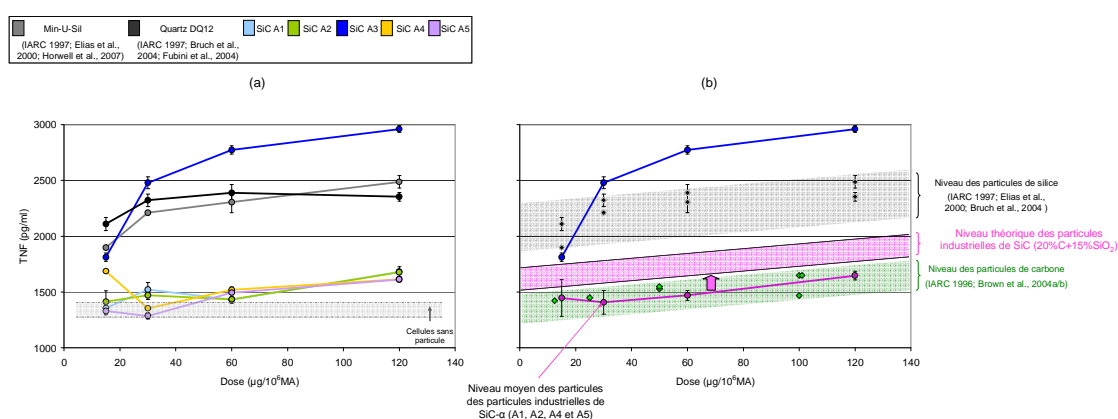
Ainsi, excepté pour l'activité radicalaire du Min-U-Sil ( $HO\bullet$ ), comparable à celle des poudres A2 et A5 ( $ns_{HO\bullet} \approx 100$  nmol/m<sup>2</sup>), les résultats RPE indiquent clairement des niveaux d'activité radicalaire par unité de surface bien supérieurs à ceux généralement observés avec des particules standards de silice (IARC, 1997).

➤ *Caractérisation de l'activité biologique*

Les résultats des tests *In Vitro* sur des macrophages de culture montrent que les particules industrielles présentent, de manière générale, une activité biologique significative : modérée sur l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ), nulle en cytotoxicité (LDH) et très significative sur le stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

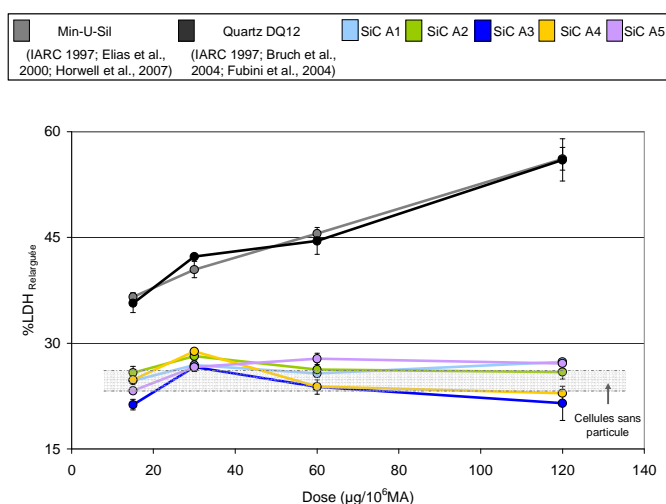
- Les particules industrielles de SiC (A1, A2, A4 et A5), présentent un niveau d'activité inflammatoire supérieur au témoin négatif de toxicité mais bien inférieur au témoin positif. On peut affirmer que les particules industrielles de SiC présentent une activité modérée sur l'état d'inflammation.

Par ailleurs, le niveau de TNF- $\alpha$  du SiC A3 est bien supérieur à celui du quartz DQ12 (Figure 73a). A en juger par ces valeurs, on peut penser que les impuretés contenues dans cette poudre (Tableau 9, Tableau 10, Tableau 11), à savoir la silice cristalline (IARC, 1997) et le carbone (IARC, 1996) ont une implication directe sur l'état inflammatoire. De plus, si l'on prend en compte les niveaux respectifs des particules de carbone et de silice cristalline dans certaines études bibliographiques (Brown et al., 2004a/b ; Bruch et al., 2004), un effet synergique de ces impuretés est fort probable (Figure 73b). En effet, si l'on calcule le niveau théorique des particules de SiC en tenant compte de la composition de la poudre A3 (20% C + 15% SiO<sub>2</sub>), celui-ci est nettement inférieur au niveau réel de la poudre de SiC A3 (Figure 73b). En d'autres termes, cet effet synergique des impuretés semble aggraver de manière significative la toxicité initiale des particules « pures » de SiC inhalées.



**Figure 73 : (a) Etude comparative avec les poudres de silices cristallines Min-U-Sil et quartz DQ12 (IARC, 1997) pour l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ). (b) Estimation de l'activité biologique des particules de SiC au regard de la bibliographie – Mise en évidence du possible effet synergique de ces impuretés**

- La cytotoxicité des particules industrielles de SiC est nulle. En effet, cette absence d'activité sur l'endommagement et la mort cellulaire (Figure 74) contraste singulièrement avec les niveaux observés pour la silice (Jhonston et al., 2000 ; Cakmak et al., 2004). Ce résultat est caractéristique des particules de SiC.



**Figure 74 : Etude comparative avec les poudres de silices cristallines Min-U-Sil et quartz DQ12 (IARC, 1997) pour la mort cellulaire (LDH)**

- Excepté pour A3, le stress oxydant à court terme (ROS) est modéré pour l'ensemble des particules industrielles avec des valeurs significatives pour les particules A2 et A5, confirmant les observations de certaines études antérieures (Bruch et Rhen, 1996 ; Svensson et al., 1997). Ces différences s'amenuisent à long terme (TOX) avec une activité très fortement marquée pour l'ensemble des particules industrielles, caractérisée par des valeurs bien supérieures à celle du témoin positif de toxicité. Ainsi, de manière générale, on peut dire que les particules industrielles de SiC présentent une activité significative du stress oxydant.

En général, on observe une activité biologique globale similaire pour les poudres de SiC A1 et A4 (Figure 68) avec un niveau modéré, qui devient significatif, principalement sur le stress oxydant, pour les particules plus fines de SiC A2 et A5 (Figure 69). La poudre de SiC A3, présente une activité biologique globale proche de celle des particules A1 et A4 (Figure 70) avec une activité inflammatoire (TNF- $\alpha$ ) beaucoup plus marquée provoquée par les impuretés de silice cristallisée et/ou de carbone qui augmentent la toxicité générale des particules pures de SiC contenues dans cette poudre (%SiC  $\approx$  65%).

➤ *Corrélations entre les caractérisations physico-chimiques et biologiques*

Conformément à notre démarche expérimentale, l'intérêt d'une telle étude est d'établir des corrélations entre les caractéristiques physico-chimiques des particules et la réponse cellulaire.

*Effet sur le stress oxydant :*

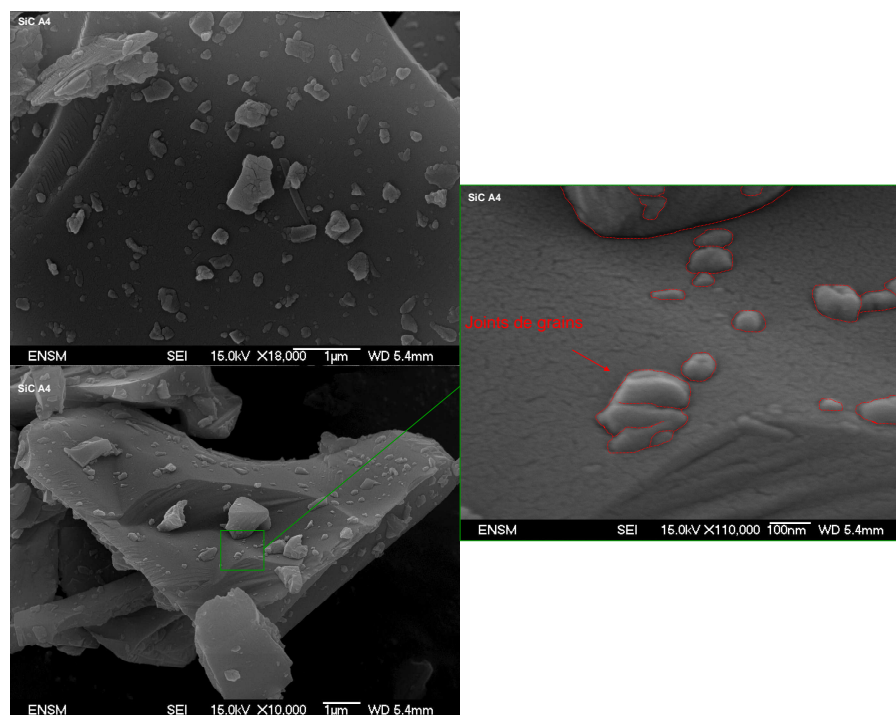
Par recoupements des données physico-chimiques et biologiques, le stress oxydant provoqué par les particules industrielles de SiC semble augmenter avec leur surface (Figure 67). Cela sous-entend que les effets observés sont principalement dus à l'interaction de sites actifs présents en surface des particules qui augmentent en nombre lorsque celle-ci augmente (Chap II, 4.1.3). Afin de mieux appréhender la nature de cette réactivité de surface, des investigations complémentaires seraient nécessaires (Chap II, 4.1.4). Nous pouvons émettre certaines hypothèses comme l'implication et l'organisation de groupements de surface (Si-OH) et/ou l'action et la nature du broyage (humide/sec). Ces aspects peuvent conditionner cette réactivité de surface (radicaux (Si•, SiO•,...), impuretés, etc.) à l'instar de ce qui a été observé sur des particules de silice (Chap II, 4.2.4). Ces aspects de la réactivité de surface, à mettre en relation avec les notions de charge et de chimie de surface, peuvent grandement influencer la nature de l'interaction cellule/particule.

*Effet sur l'activité radicalaire :*

Le fer semble être impliqué dans la génération des radicaux libres HO•. Le simple fait d'avoir du fer dans une poudre ne suffit pas à générer des radicaux libres. En effet, les particules de silice présentent une activité radicalaire différente suivant leur nature cristallographique (amorphe, quartz, etc.) (Governa et al., 2003 ; Fenoglio et al., 2005) alors que des nanotubes de carbone agissent comme des pièges à radicaux à cause de leur morphologie très spécifique (Fenoglio et al., 2006). Ainsi, d'autres paramètres (structure cristalline, morphologie) peuvent intervenir de manière indépendante ou concomitante en facilitant la réactivité spécifique de ces impuretés : meilleure répartition des ions, activité supérieure dans un réseau structuré,... (Fubini, 1998).

L'influence de la surface sur l'activité radicalaire (HO•, COO•<sup>-</sup>) est plus difficile à mettre en évidence, en particulier à cause de la différence entre les poudres (Figure 61).

Une autre hypothèse pourrait être liée à la réactivité spécifique des joints de grains en surface des particules de SiC (Figure 75). En effet, ces joints de grains sont très certainement constitués de silice (Chap IV, 2.1.1.3), dans laquelle peuvent se concentrer des impuretés (Fe, C, etc.) au cours du frittage à haute température.



**Figure 75 : Images MEB-FEG. Visualisation des joints de grains en surface des particules de SiC**

Ainsi, des caractéristiques liées à l'histoire industrielle des poudres (morphologie, état de surface, impuretés) semblent impliquées dans l'activité biologique des particules industrielles de SiC. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour mieux appréhender certains de ces divers aspects.

## 5. Conclusion

Cette étude a permis de caractériser des particules industrielles de SiC et d'en déterminer les principales caractéristiques physico-chimiques (taille, surface, morphologie, chimie, structure cristalline, état de surface, activité radicalaire). L'activité biologique de chaque poudre a été évaluée *In Vitro* sur des macrophages alvéolaires en testant différents domaines de l'activité biologique : l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ), l'endommagement et la mort cellulaire (LDH) et le stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La mise en relation des différents paramètres sur le modèle vecteur permet d'avoir une idée de l'évolution de l'activité biologique globale de chaque poudre.

	Paramètres	SiC A1	SiC A2	SiC A3	SiC A4	SiC A5
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	+	+	+++	+	+
Mort cellulaire	LDH	—	—	—	—	—
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	++	+++	++	++	+++

Nomenclature		
—	Nul	
+	Modéré	
++	Significatif	
+++	Très significatif	
++++	Extrêmement significatif	

**Tableau 12 : Résumé de l'activité biologique globale des particules industrielles de SiC**

Une activité biologique modérée (A1, A4) voire significative (A2 et A5) a été observée pour les particules industrielles de SiC. Cette activité biologique augmente avec la présence d'impuretés (SiO<sub>2</sub>, C) dans la fraction alvéolaire inhalée (SiC A3). Dans le cas des particules industrielles de SiC, la surface, la morphologie et les impuretés de fer semblent être impliquées dans une partie de l'activité biologique (stress oxydant, radicaux libres HO•).

On peut apporter un début de réponse sur l'ambiguïté évoquée dans la partie bibliographique (Chap I, 4.3.5) à savoir que les particules de SiC présentent une toxicité intrinsèque significative. Celle-ci s'en trouve augmentée grâce à un effet amplificateur voire synergique des impuretés contenues dans la fraction alvéolaire.

Il est aussi intéressant de souligner l'intérêt d'étudier différents domaines de l'activité biologique puisque une étude comparative avec des poudres de silice, sur la seule base de



l'état de l'inflammation et de la mort cellulaire (TNF- $\alpha$ , LDH), conclurait à une absence d'activité biologique des particules de SiC. On comprend alors mieux les divergences entre les rares études réalisées sur le SiC qui, soit concluent à une inertie des particules de SiC (Cichy, 1989 ; Bruch et al., 1993), soit soulignent leur possible contribution aux pneumoconioses (Bruch et Rhen, 1996 ; Svensson et al., 1997 ; Petran et al., 1999). Il est donc primordial de poursuivre le travail de recherche des principaux paramètres clefs de la réponse cellulaire afin d'établir un outil d'évaluation plus complet qui permettra une évaluation plus fiable de l'activité biologique globale des particules minérales étudiées.

La capacité de particules à rompre des liaisons et à générer des radicaux libres extrêmement réactifs (HO $\bullet$ , COO $\bullet^-$ ) est un paramètre fondamental de l'étude de l'activité biologique des particules. En effet, par transposition au milieu biologique, ces radicaux peuvent être à l'origine de dommages cellulaires irréversibles par réaction avec les composants cellulaires tels que les lipides (Lin et al., 2006 ; Lundborg et al., 2007), les protéines (Fenoglio et al., 2003 ; Governa et al. 2005), l'ADN (I. Rahman et al., 2002 ; Q. Rahman et al., 2002), etc. L'ensemble de ces effets contribue à l'entretien de la réponse cellulaire, à des modifications morphologiques des cellules et à la destruction des tissus.

En perspective, des connaissances plus approfondies de la surface des particules (quantification des groupements silanols, réactivité des joints de grains, nature des charges de surface, etc.) sont nécessaires pour avancer dans l'exploitation des données. En parallèle, l'étude de l'interaction particule/milieu (protéines, surfactant, pH, etc.) et particule/cellule (quantification et cinétique de la phagocytose, mécanismes de traversée de la membrane cytoplasmique, etc.) pourra probablement permettre de mieux comprendre les mécanismes de la réponse cellulaire. L'ensemble de ces perspectives doit permettre de mieux connaître la relation entre les caractéristiques physico-chimiques et l'activité biologique globale des particules.

## **CHAPITRE V :**

# **RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION**

## **- TRAITEMENTS THERMIQUES OXYDANTS -**

Dans cette partie, nous allons étudier des particules sur lesquelles des traitements thermiques oxydants ont été réalisés. Au vu du chapitre précédent, les particules A1 et A2 sont différentes et représentatives respectivement de particules destinées aux applications abrasives et aux filtres à particules (FAP). L'objectif du traitement thermique est de modifier la surface des particules afin de mieux en appréhender l'influence sur l'activité biologique.

Nous entamerons ce chapitre par un bref rappel sur le comportement des particules de SiC au cours de l'oxydation. Nous présenterons ensuite les principales caractéristiques physico-chimiques des particules obtenues par comparaison avec les particules initiales (Chap IV). Enfin, nous interpréterons les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité biologique (état d'inflammation, mort cellulaire, stress oxydant) afin de discuter des possibles corrélations entre l'activité biologique globale (modèle vecteur) et les principales caractéristiques des particules modifiées.

## 1. Modification de la surface des particules : traitement thermique oxydant

Nous avons sélectionné les particules A1 et A2 pour en modifier la surface via des traitements thermiques oxydants. Bien que peu d'études se soient intéressées à l'oxydation des poudres de SiC (Liu et al., 1989; Vaben et Stover, 1994; Li et al., 2000), l'oxydation du carbure de silicium monocristallin a fait l'objet de nombreux travaux (Deal et Grove, 1965 ; Singhal, 1977 ; He et Ponton, 2003). Nous allons en résumer les grandes lignes afin d'introduire nos traitements thermiques oxydants.

### 1.1. Oxydation du carbure de silicium

#### 1.1.1. Oxydation active - oxydation passive

Le SiC est un matériau réfractaire du fait de son excellente résistance à l'oxydation à haute température (ChapI, 4.1). Cette propriété est principalement liée à la stabilité intrinsèque du matériau due à la couche de silice qui se forme à sa surface. En général, au cours d'un traitement thermique oxydant, la formation de la couche d'oxyde dépend essentiellement de la pression d'oxygène et de la température (Singhal, 1977 ; Gourbilleau, 1993 ; Nickel, 1992 ; He et Ponton, 2003). Il existe deux régimes d'oxydation (Figure 76).

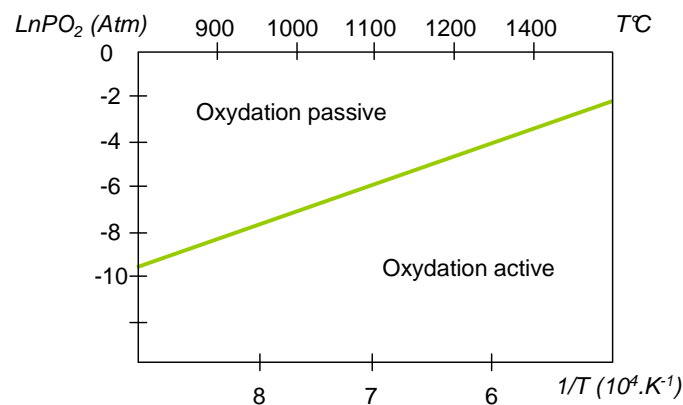
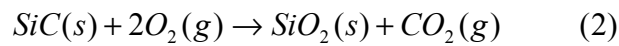
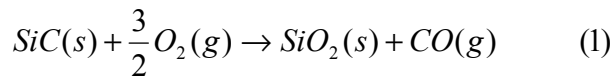
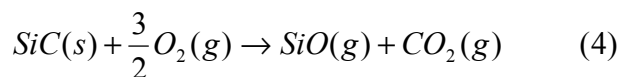
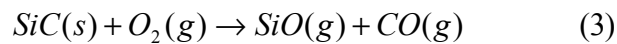


Figure 76 : Influence de la pression d'oxygène et de la température sur le régime cinétique (Singhal, 1977)

- *L'oxydation passive* : sous forte pression d'oxygène et à une température modérée, il y a formation de la phase de SiO<sub>2</sub>. La couche de silice protectrice se forme en surface des grains de SiC et la cinétique d'oxydation est contrôlée par la diffusion des espèces à travers cette couche d'oxyde.



- *L'oxydation active* : sous faible pression d'oxygène et à une température élevée, il n'y a pas de formation de couche protectrice mais une volatilisation de l'oxyde formé. La cinétique d'oxydation de ce régime est contrôlée par la vitesse de la réaction à l'interface solide/gaz.



Dans notre étude, nous souhaitons obtenir et modifier cette couche de silice en surface des particules de SiC par un traitement thermique oxydant. Pour ce faire, nous nous plaçons dans les conditions de température et pression adéquates ( $650^\circ\text{C} \leq T^\circ\text{C} \leq 1400^\circ\text{C}$  ;  $P_{\text{air}} \approx 1\text{bar}$ ).

### 1.1.2. Aspect cinétique

Lors de la réaction solide/gaz ( $\text{SiC}/\text{O}_2$ ), la formation de  $\text{SiO}_2$  va se faire par germination croissance avec formation de germes de  $\text{SiO}_2$  à partir de  $\text{SiC}$ , suivi de leur croissance par progression de l'interface  $\text{SiO}_2/\text{SiC}$  (Figure 77).

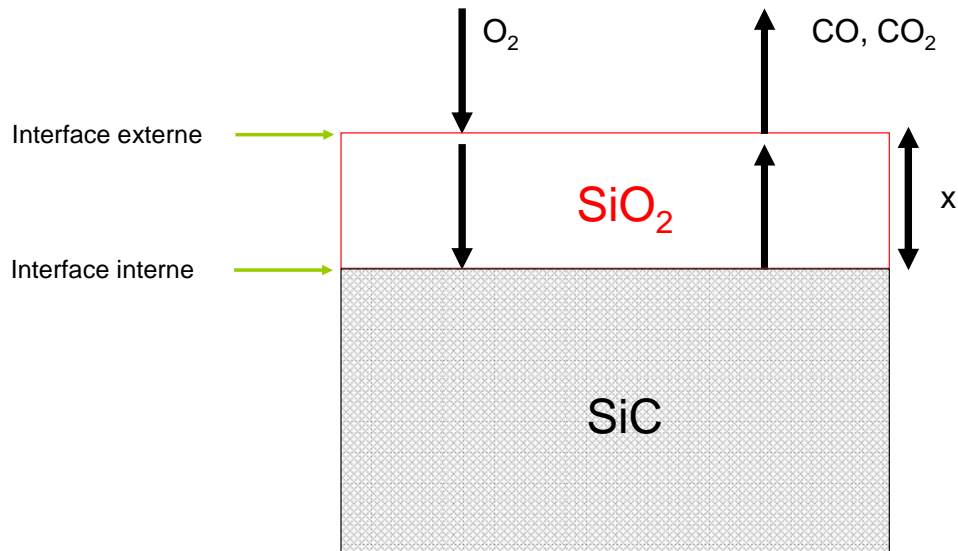
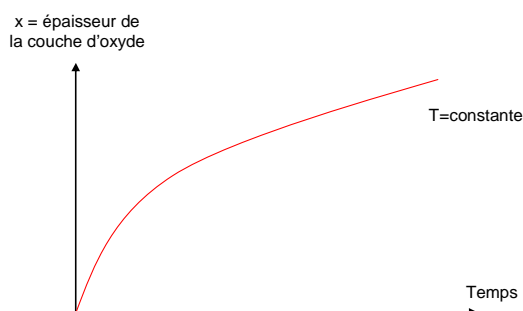


Figure 77 : Représentation schématique de l'oxydation passive de SiC (Deal et Grove, 1965)

La croissance de la silice à l'interface interne nécessite la migration de l'oxygène de l'environnement vers le substrat. Il existe théoriquement 7 étapes élémentaires pouvant régir la cinétique d'oxydation dont la plus lente constitue l'étape limitante (Deal et Grove, 1965 ; Boch, 2001) :

- 1 : diffusion de l'oxygène dans la phase gazeuse vers la surface de l'échantillon ;
- 2 : adsorption de l'oxygène sur l'interface externe ;
- 3 : passage de l'oxygène de la phase adsorbée à la phase solide ;
- 4 : diffusion de l'oxygène dans  $\text{SiO}_2$  vers le substrat, en raison du gradient de concentration ;
- 5 : réaction d'oxydation à l'interface interne ;
- 6 : diffusion vers l'extérieur des espèces gazeuses formées ( $\text{CO}$  et  $\text{CO}_2$ ) ;
- 7 : désorption gazeuse.

La diffusion de l'oxygène vers le substrat étant l'étape la plus lente, la quantité d'oxygène qui réagit, diminue quand l'épaisseur de la couche de silice augmente. Si la réaction d'oxydation se produit à température constante, on observe une décroissance monotone de la vitesse d'oxydation ( $dx/dt$ ) sur la courbe représentant l'épaisseur de la couche de silice en fonction du temps (Figure 78).



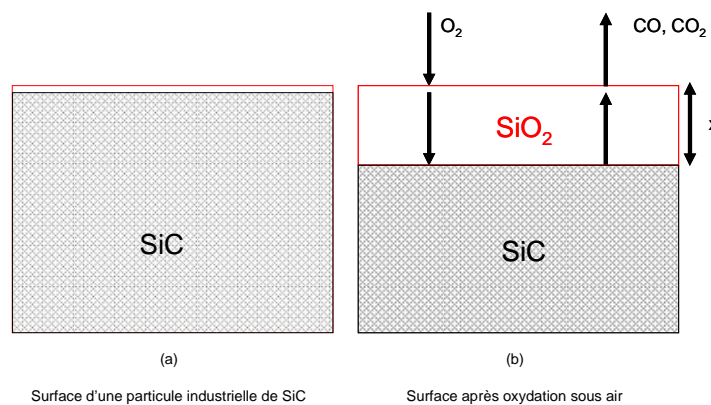
**Figure 78 : Evolution de l'épaisseur de la couche de  $\text{SiO}_2$  en fonction du temps (Shi et al., 2001)**

En général, les travaux (Deal et Grove, 1965 ; Suzuki et al., 1982) montrent que la croissance se fait de façon linéaire aux temps courts. Le régime obéit ensuite rapidement à une loi parabolique indiquant une croissance limitée par la diffusion des espèces gazeuses chimiques à travers l'oxyde. Il est en général admis que les mécanismes d'oxydation s'effectuent via la forme moléculaire de l'espèce diffusante pour des températures inférieures à  $1350^\circ\text{C}$  alors que la diffusion sous forme ionique est prépondérante au-delà (Costello et Tressler, 1986 ; Zheng et al., 1990 ; Quanli et al., 2007).

Ainsi, la surface des particules de  $\text{SiC}$  va subir de profonds changements dont nous souhaitons déterminer l'influence sur la réponse cellulaire.

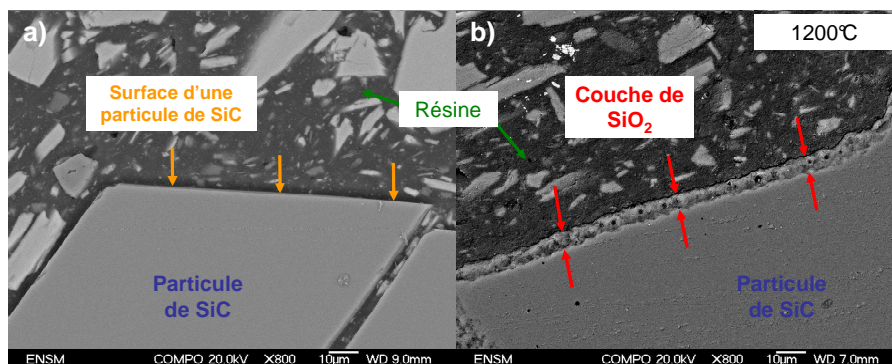
### 1.1.3. Surface des particules oxydées de SiC

Les caractéristiques de cette couche superficielle de silice sont importantes dans la mesure où celle-ci conditionne l'interaction cellule/particule. Nous avons vu (Chap IV, 2.2.3) que les grains de SiC sont recouverts par une très fine couche de silice amorphe (Deal et Grove, 1965 ; Filipuzzi, 1991). Dans un premier temps, le traitement thermique oxydant aura pour effet d'augmenter l'épaisseur de cette couche de silice. Ensuite, celle-ci cristallisera progressivement à partir de 1100°C-1200°C (Boch, 2001) en cristobalite, forme stable de la silice à haute température (Legrand et al., 1998).



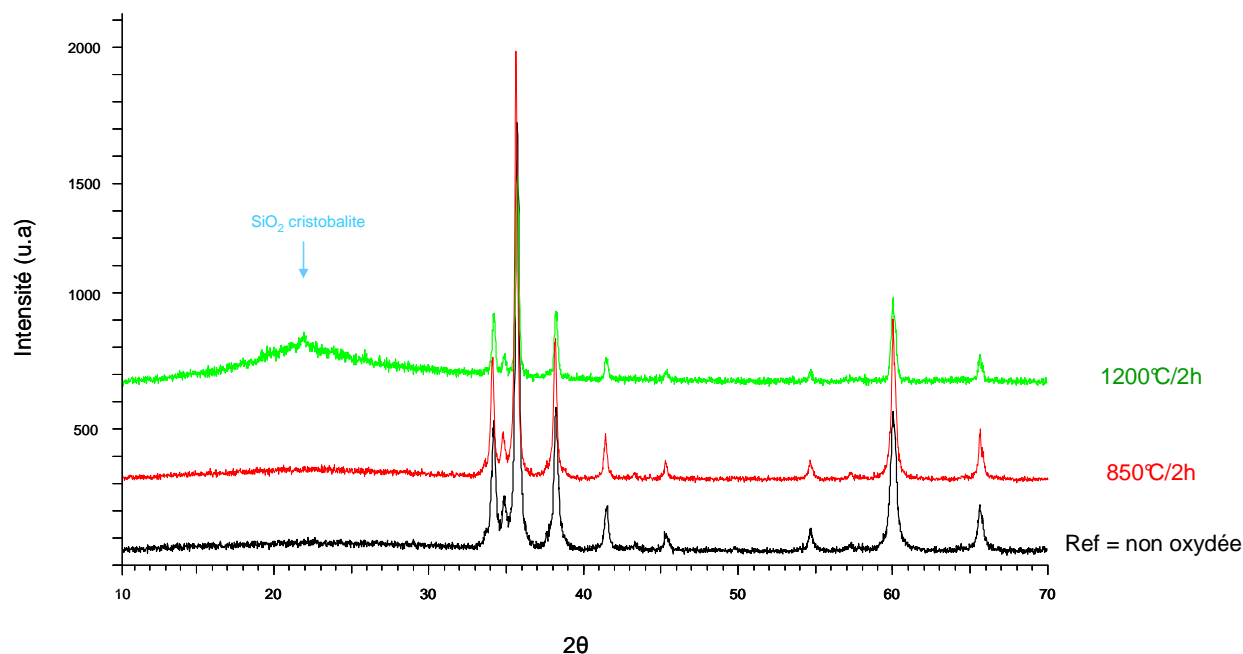
**Figure 79 : Représentation de la surface d'une particule de SiC (a) avant et (b) après traitement thermique oxydant. La couche de silice cristallise progressivement en cristobalite ( $T \geq 1100^\circ\text{C}$ )**

En effet, l'observation de surfaces oxydées de particules de SiC- $\alpha$  après enrobage et polissage dans une résine (Figure 80), confirme le développement anisotrope de cette couche de silice en accord avec les données bibliographiques (Deal et Grove, 1965 ; Filipuzzi, 1991).



**Figure 80 : Développement anisotrope de la couche de silice au cours de l'oxydation. Images MEB-FEG de particules de SiC- $\alpha$  enrobées et polies dans une résine en diallylphthalate : (a) particules non oxydées (b) particules oxydées à 1200°C/10h sous air.**

La cristallisation de la couche de SiO<sub>2</sub> en surface des particules de SiC est détectable par diffractométrie des rayons X (Figure 81) pour des températures d'oxydation supérieures à 1200°C.



**Figure 81 : Diffractogrammes des particules de SiC A2 après traitement oxydant sous air à différentes températures**

En effet, lors de l'oxydation du SiC, la cristobalite se forme au sein de la structure amorphe par dévitrification de cette dernière (Gourbilleau et al., 1993). La présence d'impuretés au sein du SiC peut abaisser la température de formation de la phase cristalline (Macdowell et Beall, 1969 ; Singhal 1977 ; Costello et Tressler, 1981) et accélérer la cinétique d'oxydation (Singhal et Lange., 1975 ; Costello et Tressler, 1981 ; Costello et al., 1981).

En conclusion, les particules de SiC sont initialement recouvertes d'une couche de silice amorphe (ChapIV, 2.2.3). Cette couche va donc progressivement être modifiée pour finalement cristalliser à haute température en cristobalite (Deal et Grove, 1965 ; Suzuki et al., 1982 ; Boch, 2001). Ainsi, au moyen de traitements thermiques oxydants, nous souhaitons mettre en évidence l'influence de ces changements de surface sur l'activité biologique des particules.



## 1.2. Caractérisations physico-chimiques

Des traitements thermiques oxydants de 2 heures sous air aux températures suivantes : 650°C, 750°C, 850°C et 1400°C sont effectués sur les particules de SiCA1 et A2.

### 1.2.1. Principales caractéristiques des particules oxydées A1 et A2

#### ➤ *Taille et surface*

Pour des traitements thermiques oxydants à basse température\* (650°C, 750°C et 850°C), les valeurs de surfaces spécifiques (Tableau 13) sont similaires à celles des particules de référence\* (non oxydées). En revanche, le frittage à haute température (1400°C) entraîne une forte diminution de celle-ci.

Echantillons	REF	Température d'oxydation (°C)			
		650	750	850	1400
SiC A1	4	≈ 3-4	≈ 3-4	≈ 3	< 1
SiC A2	11	≈ 11	≈ 10-11	≈ 10	≈ 3

**Tableau 13 : Surfaces spécifiques (m<sup>2</sup>/g) des particules industrielles de SiC**

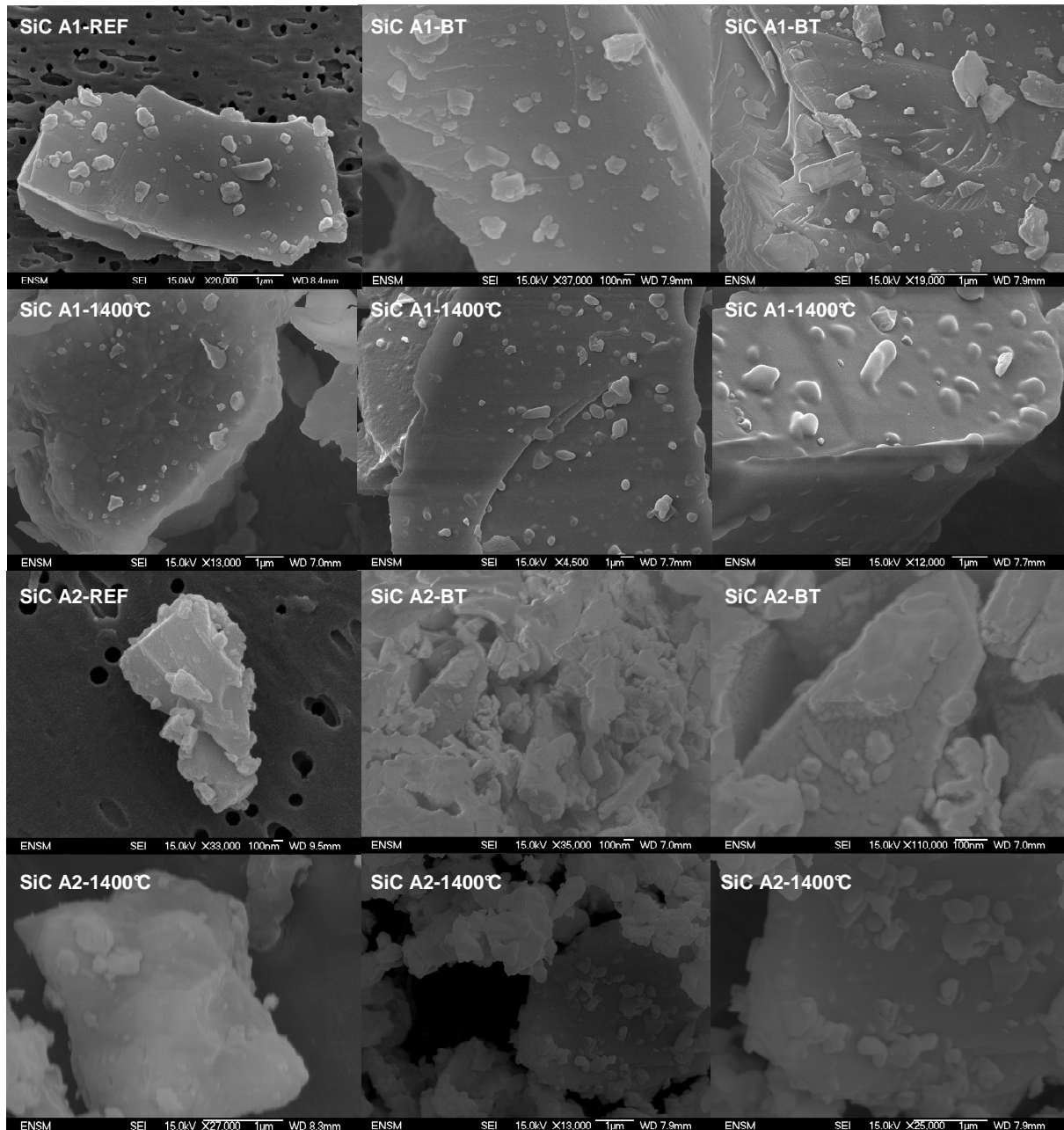
#### ➤ *Morphologie des particules*

Les observations en microscopie électronique au MEB-FEG (Figure 49) nous permettent d'obtenir des informations (taille, forme, aspect de surface) sur les particules oxydées par rapport aux particules de référence.

---

\* Les traitements thermiques à basse température, noté « BT » correspondent à ceux effectués à 650°C, 750°C et 850°C. Les caractéristiques des particules oxydées correspondantes sont généralement similaires.

\* Particules de référence : les particules A1 et A2 étudiées au chapitre IV sont dites de références (REF) ou non oxydées. Elles correspondent aux particules n'ayant pas subi de traitements thermiques oxydants.



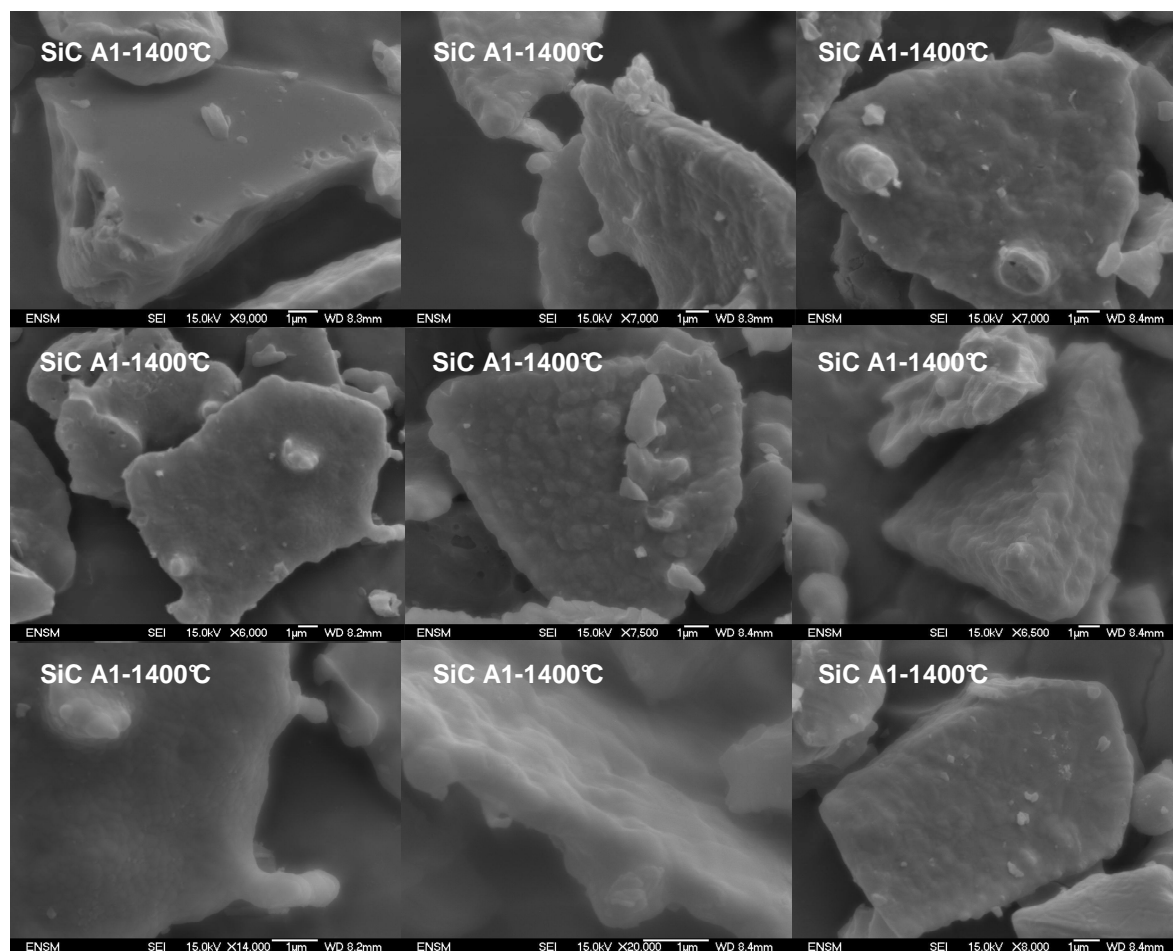
**Figure 82 : Images MEB-FEG des particules industrielles de SiC après un traitement thermique oxydant à basse température (BT = 650, 750 et 850°C) et haute température (1400°C)**

▪ **Traitement thermique oxydant à basse température :**

Les échantillons oxydés ne présentent pas de différences morphologiques importantes avec les particules initiales (Figure 49). Les seuls changements visibles correspondent à un aspect de surface légèrement moins lisse et plus blanchâtre en contraste de phase. En accord avec les données bibliographiques (Shi et al., 2001 ; Das et al., 2004), nous pouvons penser que dans cette gamme de température, l'oxydation du SiC est très faible, voire n'a pas encore débuté.

▪ Traitement thermique oxydant à haute température (1400°C) :

La morphologie est fortement modifiée. Ce phénomène est plus facilement observable pour les particules grossières. On observe un recouvrement de la surface par une couche comparable à une phase vitreuse. Les particules nanométriques et submicroniques fixées en surface de grains plus larges (Chap IV, 2.1.2) semblent plus arrondies et « engluées » dans cette couche superficielle (Figure 49, Figure 50). L'aspect des grains est principalement caractérisé par des arêtes moins coupantes aux bords plus arrondis (Figure 49, Figure 50).



**Figure 83 : Images MEB-FEG de particules industrielles de SiC A1 oxydées à haute température (1400°C). Observations des principaux changements de la morphologie des particules oxydées**

Ainsi, les changements morphologiques sont mineurs voire inexistantes pour les particules oxydées à basse température. A 1400°C, la morphologie change d'une manière importante avec un aspect de surface moins lisse, des arêtes moins coupantes aux bords arrondis visiblement recouverts par une couche qui semble « engluier » les particules nanométriques et submicroniques fixées sur les particules plus larges.

➤ *Analyse cristallographique*

L'analyse de la structure cristallographique des particules par diffractométrie des rayons X permet d'identifier la nature de la phase de silice comme étant de la cristobalite. Cette phase est uniquement détectable dans les échantillons A1 et A2 oxydés à 1400°C.

➤ *Composition chimique*

Les analyses chimiques permettent de mettre en évidence l'oxydation des particules de SiC (Tableau 14) en évaluant la teneur en oxygène des poudres de SiC.

Echantillon	A1	A1-650	A1-750	A1-850	A1-1400	A2	A2-650	A2-750	A2-850	A2-1400
% O	0,4	0,6	0,6	0,7	7	1,0	2,5	3,0	4,0	27,0
% C <sub>libre</sub>	0,6	0,3	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	1,3	0,6	0,6	0,4	≤ 0,1
C/Si at.	0,98	0,95	0,95	0,95	0,85	1,00	0,94	0,92	0,90	0,50

**Tableau 14 : Composition chimique des poudres oxydées de SiC**

Ces analyses semblent souligner un comportement différent des poudres A1 et A2 au cours des traitements thermiques oxydants.

▪ Particules A1 :

De manière générale, les traitements thermiques oxydant à basse température ne modifient que légèrement les particules (%O ≤ 1%, C/Si ≥ 0,95) qui conservent sensiblement les mêmes caractéristiques que celles des particules de référence. Ces résultats contrastent avec les changements observés à haute température (%O ≈ 7%, C/Si ≈ 0,85).

▪ Particules A2 :

Les particules A2 s'oxydent plus rapidement que les particules A1 dès les basses températures (%O ≈ 2,5-4%, C/Si ≥ 0,90). A haute température, les changements sont plus significatifs avec des caractéristiques (%O ≈ 27%, C/Si ≈ 0,5) qui s'éloignent de celles des particules de référence.

Dans les deux cas, le carbone libre qui s'oxyde facilement (CO<sub>2</sub>, CO), disparaît de la surface des échantillons.

➤ *Etat de surface des poudres*

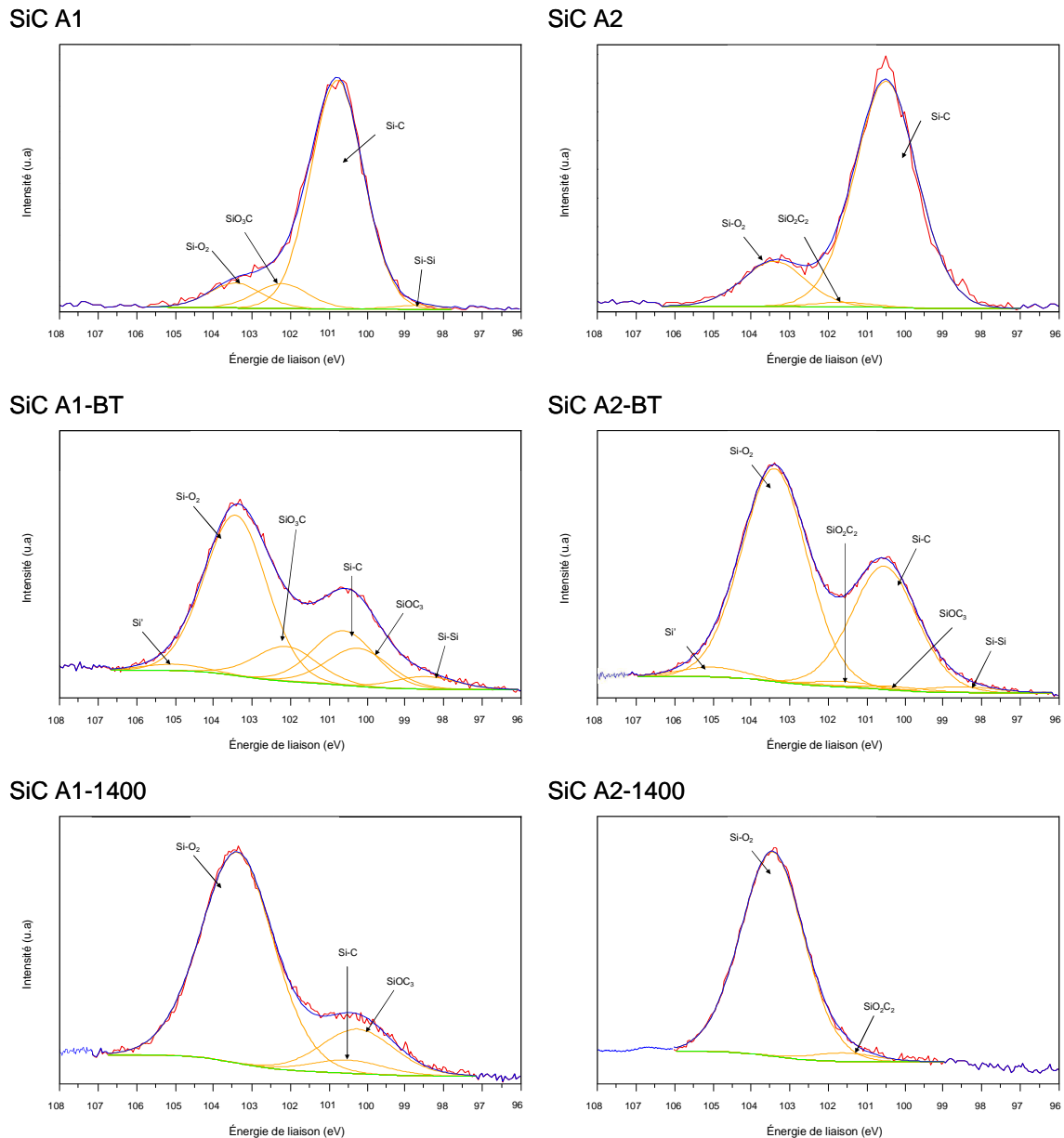
Le pourcentage atomique et les informations relatives à la décomposition spectrale des différents signaux  $Si_{2p}$ ,  $O_{1s}$  et  $C_{1s}$  ont été résumés dans le Tableau 15.

		Echantillons					
		A1	A1-BT	A1-1400	A2	A2-BT	A2-1400
Pourcentage atomique (%)	$Si_{2p}$	45	≈ 30	29	44	≈ 33	30
	$C_{1s}$	38	≈ 25	18	34	≈ 16	≈ 10
	$O_{1s}$	17	≈ 45	53	22	≈ 51	60
Principale composition des pics	$Si_{2p}$	Si-C, Si-O <sub>2</sub> , SiO <sub>3</sub> C, SiO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> , SiOC <sub>3</sub> , Si-Si, Si'					
	$C_{1s}$	C-Si, C-C, Si-O <sub>x</sub> C <sub>y</sub> , C-O, C=O					
	$O_{1s}$	O <sub>2</sub> -Si, Si-O <sub>x</sub> C <sub>y</sub> , O', O''					

**Tableau 15 : Pourcentage atomique et principale composition de surface des poudres industrielles de SiC**

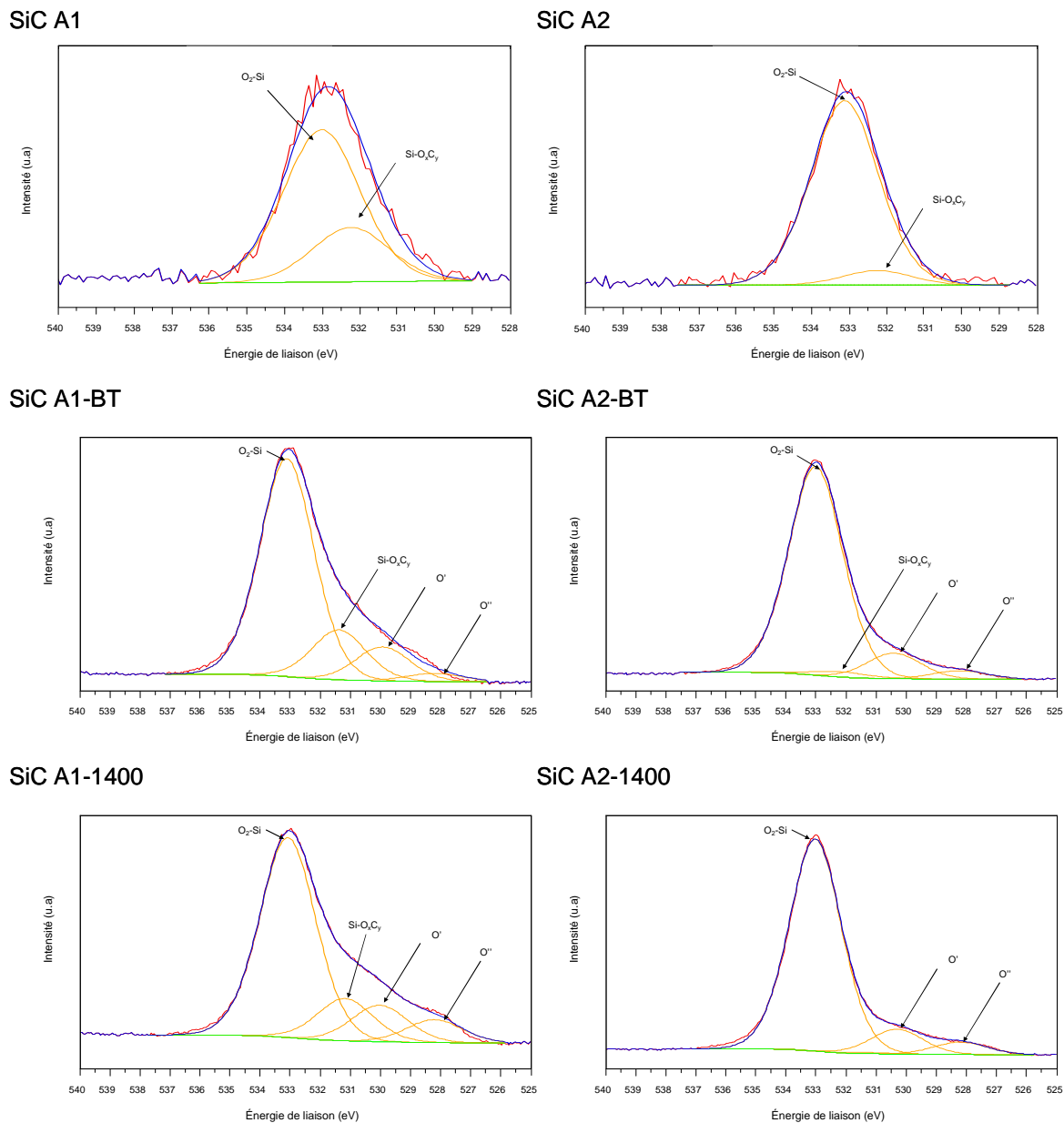
Le signal de l'oxygène ( $O_{1s}$ ), en rapport direct avec l'oxydation, augmente significativement dès les basses températures pour atteindre des pourcentages élevés à haute température (%O ≈ 50-60%). Il y a donc, dès les basses températures, un début d'oxydation en surface des particules de SiC.

Ces analyses confirment l'évolution de l'interface SiC/SiO<sub>2</sub> à l'intérieur du grain de SiC conformément à l'étude bibliographique (ChapV, 1.1). En effet, on observe une augmentation de l'épaisseur de la couche d'oxyde, à en juger par l'évolution de la composante attribuée à la silice (liaison Si-O<sub>2</sub>), au bénéfice d'une diminution caractéristique du pic relatif au SiC (liaison Si-C) (Figure 84, Figure 85).



**Figure 84 : Décomposition des spectres de photoémission du niveau de cœur  $\text{Si}_{2p}$  observés par analyse de la surface des poudres industrielles oxydées de SiC A1 et A2 après un traitement thermique à basse température ( $650^\circ\text{C}$ ,  $750^\circ\text{C}$ ,  $850^\circ\text{C}$  noté BT) et à haute température ( $1400^\circ\text{C}$ )**

On peut détecter un pic vers les faibles énergies, noté ( $\text{O}''$ ), mais qu'il est très difficile d'interpréter, pouvant être attribué à des liaisons de type oxygène moléculaire (liaison O–O) (Kim et Davis, 1973; Rousseau et al., 1998). On peut cependant penser à des structures complexes liées à la dévitrification de la silice amorphe et à sa cristallisation progressive (Mieskowski et al., 1984; Li et al., 1990; Eveno et al., 1993).

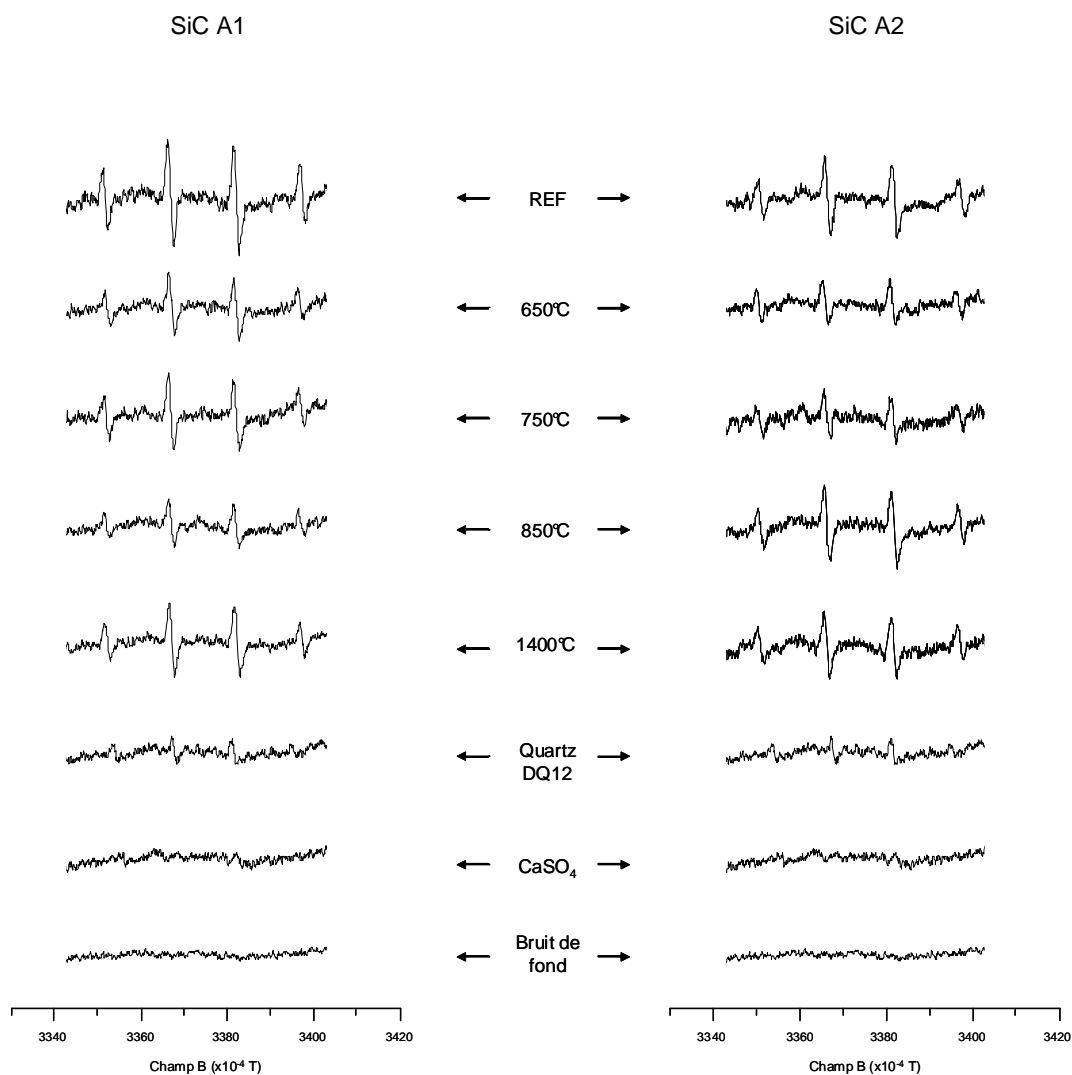


**Figure 85 : Décomposition des spectres de photoémission du niveau de cœur  $O_{1s}$  observés par analyse de la surface des poudres industrielles oxydées de SiC A1 et A2 après un traitement thermique à basse température (650°C, 750°C, 850°C noté BT) et à haute température (1400°C)**

Dès les basses températures, l'épaisseur de la couche de silice en surface des grains de SiC augmente au cours du traitement thermique oxydant. L'état de surface sur les premiers nanomètres est modifié avec pour principales caractéristiques une augmentation de la teneur en oxygène ( $O_{1s}$ ) et une diminution de la contribution en carbone ( $C_{1s}$ ).

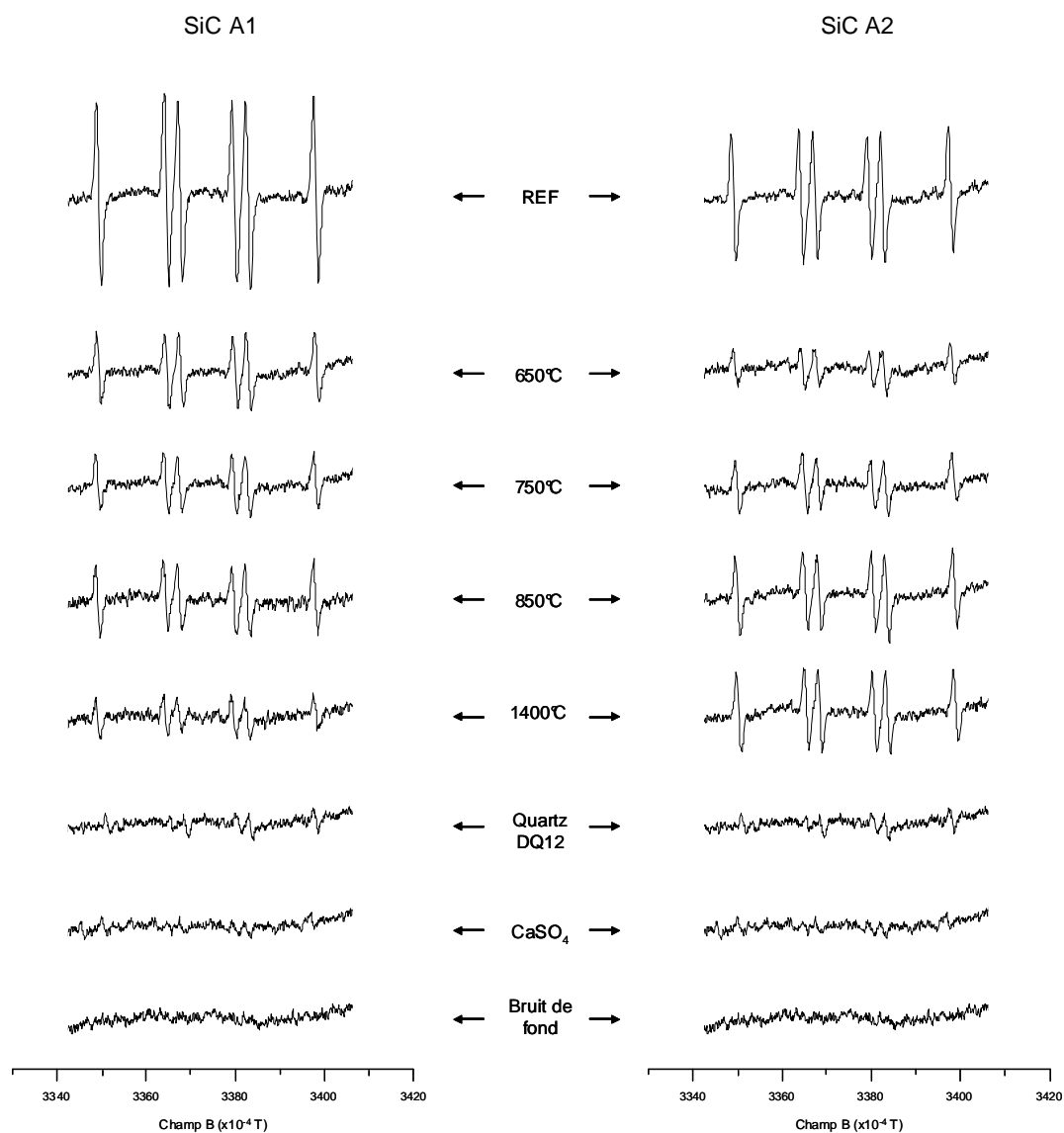
### 1.2.2. Activité radicalaire : HO•, COO•

Les résultats obtenus soulignent une activité radicalaire prononcée pour l'ensemble des particules étudiées (Figure 57, Figure 58).



**Figure 86 : Signaux RPE de l'adduit [DMPO-OH]• obtenus en présence des poudres industrielles oxydées de SiC A1 et A2. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres HO• générés**

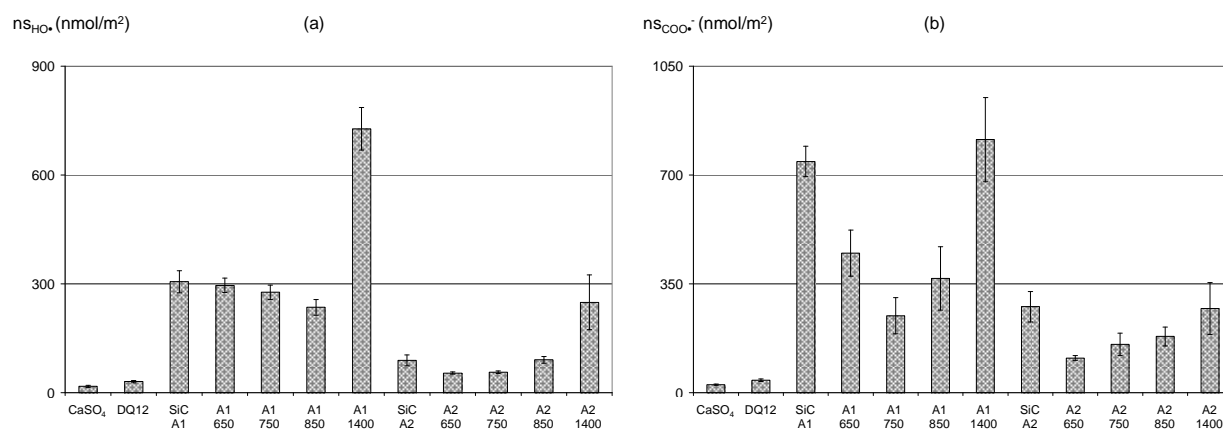




**Figure 87 : Signaux RPE de l'adduit  $[\text{DMPO-COO}]^\bullet$  obtenus en présence des poudres industrielles oxydées de SiC A1 et A2. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres  $\text{COO}^\bullet$  générés**

Pour les deux tests, les particules industrielles oxydées présentent une capacité à générer des radicaux libres  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{COO}^\bullet$ . Néanmoins, on observe une baisse de l'intensité des signaux avec le traitement thermique oxydant par rapport au signal des particules de référence.

La quantification de l'activité radicalaire ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ) permet de comparer les différents signaux en tenant compte des caractéristiques des particules oxydées. Ainsi, on constate pour les particules oxydées à basse température, une baisse de la capacité à générer des radicaux libres alors que l'on observe une augmentation pour celles oxydées à haute température (Figure 59).



**Figure 88 : Activité radicalaire des poudres industrielles oxydées de SiC A1 et A2 en milieu acellulaire pour la génération des radicaux (a)  $\text{HO}\cdot$  et (b)  $\text{COO}\cdot^-$**

▪ Particules A1 :

On note une diminution de l'activité radicalaire pour les particules oxydées à basse température avec respectivement une diminution significative de 5% à 25% pour le radical hydroxyle ( $15 \text{ nmol/m}^2 \leq \Delta n_{\text{HO}\cdot} \leq 80 \text{ nmol/m}^2$ ) et de 40% à 70% pour le radical carboxyle ( $300 \text{ nmol/m}^2 \leq \Delta n_{\text{COO}\cdot^-} \leq 525 \text{ nmol/m}^2$ ). Par ailleurs, bien que la quantité de radicaux générés soit inférieure pour les particules oxydées à haute température, l'activité radicalaire par unité de surface augmente significativement ( $\approx 150\%$ ) pour le radical  $\text{HO}\cdot$  ( $\Delta n_{\text{HO}\cdot} \approx 450 \text{ nmol/m}^2$ ) et très sensiblement ( $\approx 10\%$ ) pour le radical  $\text{COO}\cdot^-$  ( $\Delta n_{\text{COO}\cdot^-} \approx 75 \text{ nmol/m}^2$ ).

▪ Particules A2 :

Les particules A2 oxydées à basse température présentent une diminution significative de l'activité radicalaire de 5% à 35% ( $5 \text{ nmol/m}^2 \leq \Delta n_{\text{HO}\cdot} \leq 40 \text{ nmol/m}^2$ ) pour le radical  $\text{HO}\cdot$  et de 35% à 65% pour le radical  $\text{COO}\cdot^-$  ( $100 \text{ nmol/m}^2 \leq \Delta n_{\text{COO}\cdot^-} \leq 200 \text{ nmol/m}^2$ ). A haute température, on observe le même effet que pour les particules A1, à savoir une augmentation importante de l'activité radicalaire ( $\approx 150\%$ ) pour le radical  $\text{HO}\cdot$  ( $\Delta n_{\text{HO}\cdot} \approx 150 \text{ nmol/m}^2$ ) et

une tendance moins marquée pour le radical  $\text{COO}\cdot^-$  avec des valeurs comparables à celles des particules de référence ( $n_{\text{COO}\cdot^-} \approx 300 \text{ nmol/m}^2$ ).

Nous avons vu précédemment (Chap IV, 2.3) que le fer agit vraisemblablement via des mécanismes de réaction en chaîne comme la réaction de Fenton (Fubini et Mollo, 1995 ; Fubini et Hubbard, 2003). Ici, une possible interprétation des résultats consisterait à prendre en considération l'état chimique du fer en surface des grains de SiC.

En effet, le traitement oxydant permet l'oxydation du fer II en fer III présent en surface des grains de SiC (Park et al., 1999 ; Valette, 2004 ; Mauvernay et al., 2007). Or, certaines études (Borm et al., 2004 ; Fenoglio et al., 2001 ; Tomatis et al., 2002) ont permis de mettre en évidence le rôle des métaux dans la production de radicaux  $\text{HO}\cdot$  et des différences de réactivité en fonction de leur degré d'oxydation. A titre d'exemple, alors que le vanadium  $\text{V}^{2+}$  et  $\text{V}^{5+}$  ont une activité semblable, le  $\text{Fe}^{2+}$  est trois fois plus actif que le  $\text{Fe}^{3+}$  (Shi et al., 2003 ; Fubini, 2007). Ainsi, cette baisse généralisée du signal pour des particules oxydées à basse température semble en accord avec les résultats observés sur des particules de silice et des fibres d'amiante (Fenoglio et al., 2001 ; Tomatis et al., 2002 ; Fubini, 2007).

De plus, bien qu'il n'existe pas de données précises à ce sujet, il est connu (Fubini, 2007) que la réactivité du fer augmente lorsque celui-ci se retrouve dans un réseau ordonné en surface des grains ce qui est en effet le cas dans la couche cristallisée de  $\text{SiO}_2$  (cristobalite) qui ne se forme que pour les particules oxydées à haute température. Cette observation peut permettre d'expliquer en partie l'augmentation de l'activité radicalaire pour les particules oxydées A1 et A2 à haute température (1400°C). Néanmoins, à défaut de résultats explicites, on ne peut exclure l'implication d'autres paramètres (degré de coordination de ces ions, morphologie, autres impuretés, etc.) dans ces mécanismes de génération des radicaux (Pritchard et al., 1996 ; Gavet et al., 1997 ; Knaapen et al., 2002).

De plus, on observe, comme au chapitre précédent (Chap IV, 2.3), une diminution de l'activité radicalaire en fonction de la surface des particules même si il reste difficile de conclure sur l'implication de ce paramètre.

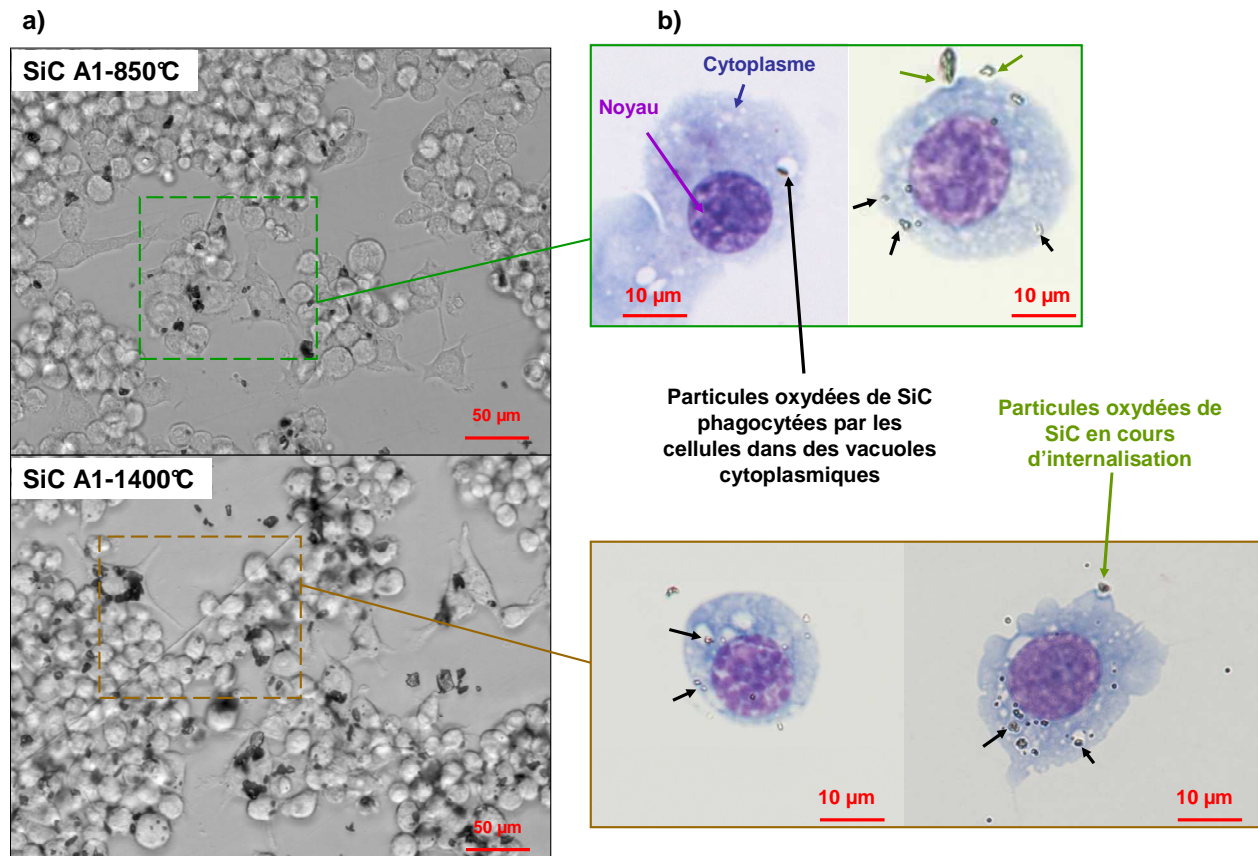
Ainsi, de simples recuits thermiques sous air à des températures inférieures à 850°C, peuvent conduire à diminuer l'activité radicalaire des particules de SiC sans altérer d'une manière importante les caractéristiques des particules de SiC.

L'oxydation du fer II en fer III peut conduire à une diminution du signal dans cette gamme de température. A haute température, une augmentation significative du signal pour l'ensemble des radicaux ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ) est observée et s'explique par une activité plus importante du fer dans un réseau cristallisé de silice associé à une baisse de la surface spécifique.

La distinction et la quantification du fer II et fer III en surface des particules pourraient permettre de mieux comprendre ces mécanismes.

### 1.3. Activité biologique

Nous allons évaluer l'activité biologique des particules oxydées en suivant l'intensité de la réponse cellulaire au cours de la phagocytose (Figure 89).



**Figure 89 :** Images en microscopie optique (*Olympus, IX2-UCB*). (a) Aspect du fond d'un puits de culture après 24h de contact entre les macrophages (RAW 264.7) et les particules oxydées. (b) Visualisation de particules industrielles internalisées dans des vacuoles cytoplasmiques et en cours d'internalisation (coloration sur lame au MGG : May-Grunwald Giemsa).

Cette interaction particule/macrophage va nous permettre de mettre en évidence des différences dans l'activité biologique entre les particules oxydées et non oxydées au regard des caractéristiques structurales déterminées précédemment. Pour se faire, nous allons suivre l'évolution de l'état d'inflammation ( $\text{TNF-}\alpha$ ), de l'endommagement et mort cellulaire (LDH) et du stress oxydant ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### 1.3.1. Evaluation de la réponse cellulaire (TNF- $\alpha$ , LDH et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

#### ➤ Etat d'inflammation : TNF- $\alpha$

Le dosage de la cytokine pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$ ) nous donne les résultats représentés sur la Figure 90.

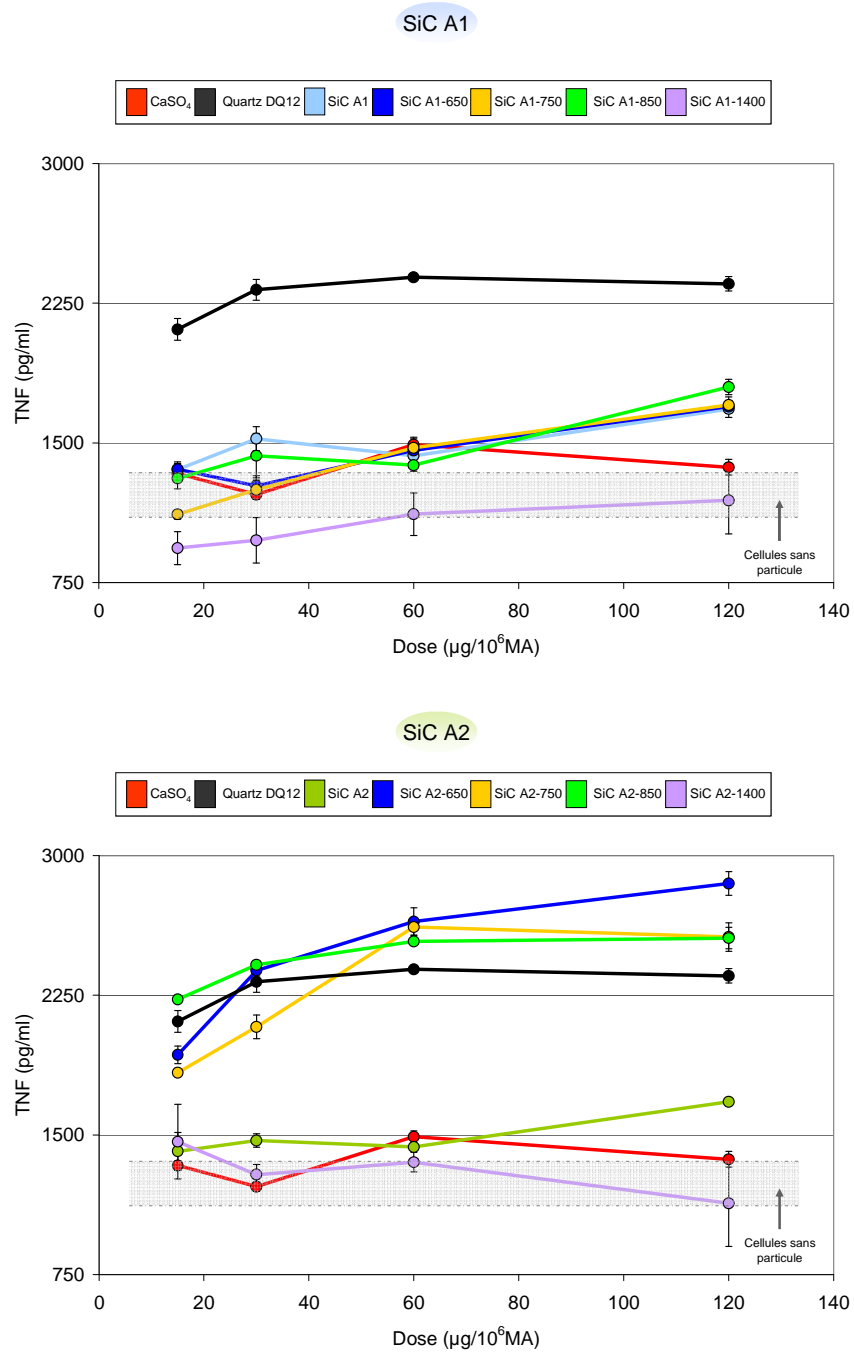


Figure 90 : Etat d'inflammation (TNF- $\alpha$ ) des macrophages après 24h de contact avec les particules oxydées de SiC A1 et A2

- Particules A1 :

Il n'y a pas de différence notable entre les particules oxydées à basse température et les particules de référence. Les valeurs restent bien en dessous du témoin positif de toxicité et témoignent d'une activité modérée sur ce paramètre. A noter cependant, le niveau très faible en dessous du témoin négatif de toxicité des particules oxydées à haute température.

- Particules A2 :

Les particules oxydées à basse température ont une activité biologique très significative avec des valeurs supérieures à celles du témoin positif de toxicité (Quartz DQ12) et très au dessus du niveau des particules de référence. De la même façon que précédemment, les particules oxydées à haute température présentent une activité très faible au niveau du témoin négatif de toxicité.

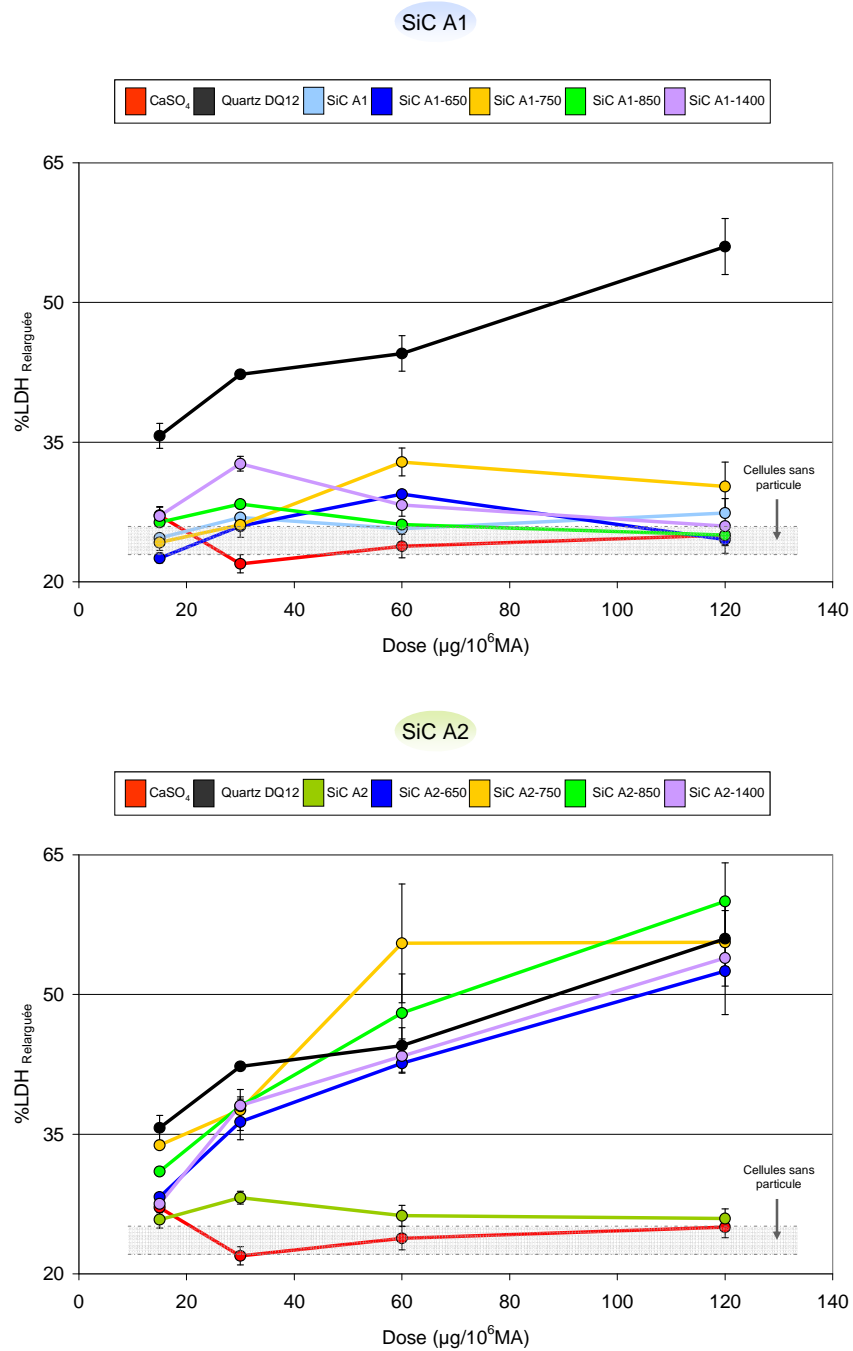
Les particules A1 et A2, présentant des comportements différents au cours de l'étape d'oxydation, possèdent des activités biologiques différentes.

Les modifications mineures de surface intervenant dès les basses températures (ChapV, 1.2.1) conduisent à des résultats contradictoires pour A1 et A2.

Dans les deux cas, la baisse significative de l'activité biologique pour les particules oxydées à 1400°C conduit à un paradoxe puisque ces particules sont recouvertes par une couche de cristobalite connue pour son activité inflammatoire importante (IARC, 1997). Ainsi, il est possible que la morphologie spécifique de ces particules (ChapV, 1.2.1) voire même de la couche de cristobalite (rugosité, microporosité : Figure 80) contribue à diminuer l'activité biologique de ces particules en milieu cellulaire pour ce paramètre (TNF- $\alpha$ ).

➤ *Endommagement et mort cellulaire : LDH*

Le dosage de la LDH dans les surnageants de culture permet d'évaluer la cytotoxicité des particules oxydées de SiC (Figure 91).



**Figure 91 : Endommagement et mort cellulaire (LDH) après 24h de contact avec les particules oxydées de SiC A1 et A2**

▪ Particules A1 :

L'ensemble des valeurs se situe au niveau du témoin négatif de toxicité et des cellules sans particule ( $\%LDH_{Relarguée} \leq 30\%$ ), bien en dessous du témoin positif de toxicité ( $\%LDH_{Relarguée} \approx 55\%$ ). Ces résultats confirment une absence de différence entre les particules oxydées et non oxydées dont l'activité est nulle pour ce paramètre.



- Particules A2 :

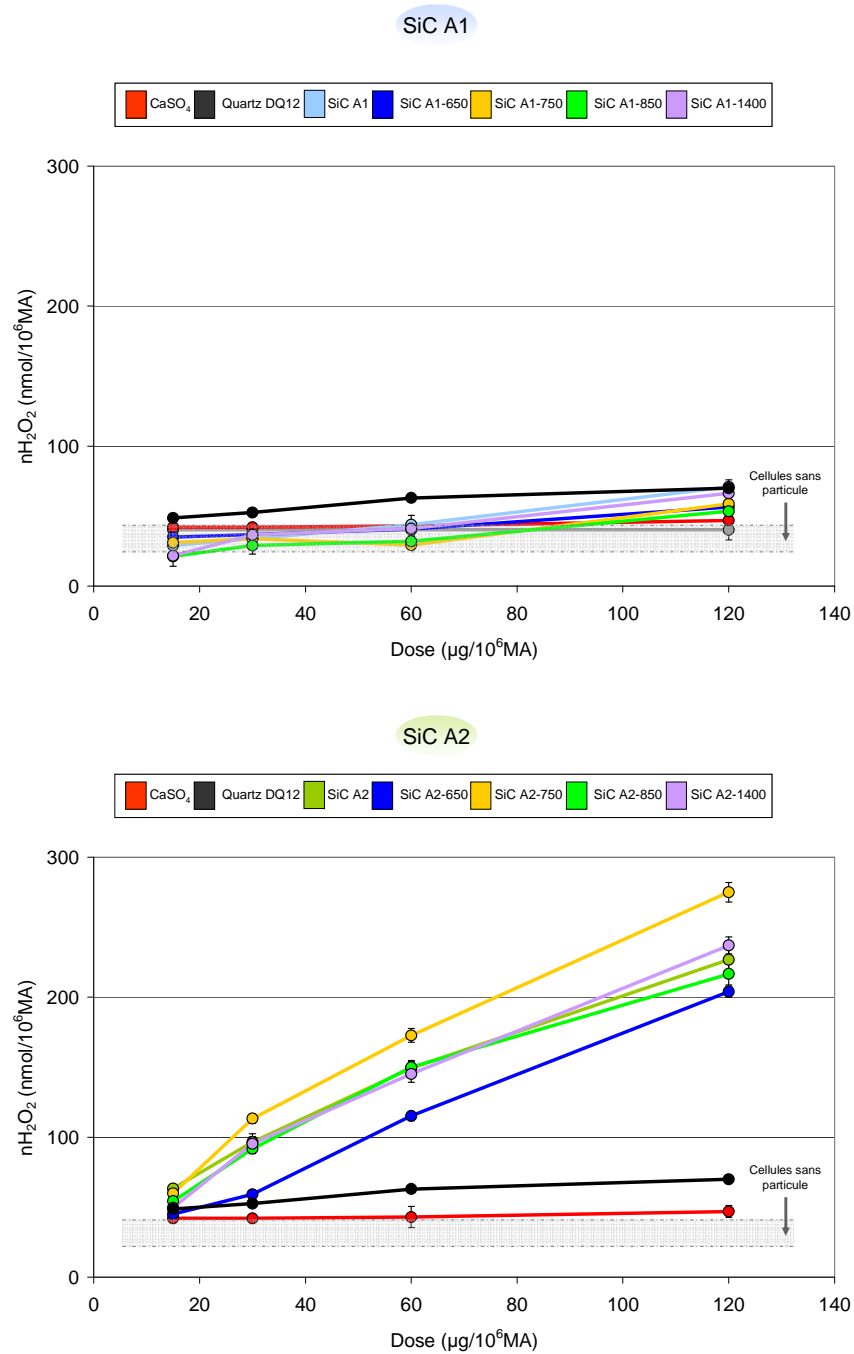
Quelle que soit la température du traitement thermique oxydant, les particules oxydées présentent une activité cytotoxique comparable à celle du témoin positif de toxicité ( $\%LDH_{\text{Relarguée}} \geq 50\%$ ). Ce résultat très important traduit une activité cytotoxique très significative des particules oxydées qui contraste singulièrement avec l'activité nulle observée pour les particules de référence.

L'expression des résultats en fonction de la surface des particules (cf. Annexe H) ne met pas en évidence l'implication de ce paramètre (TNF- $\alpha$ , LDH) dans la réponse cellulaire.

- *Stress oxydant : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Le dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en milieu extracellulaire permet d'évaluer le stress cellulaire provoqué par les particules oxydées de SiC sur les macrophages.

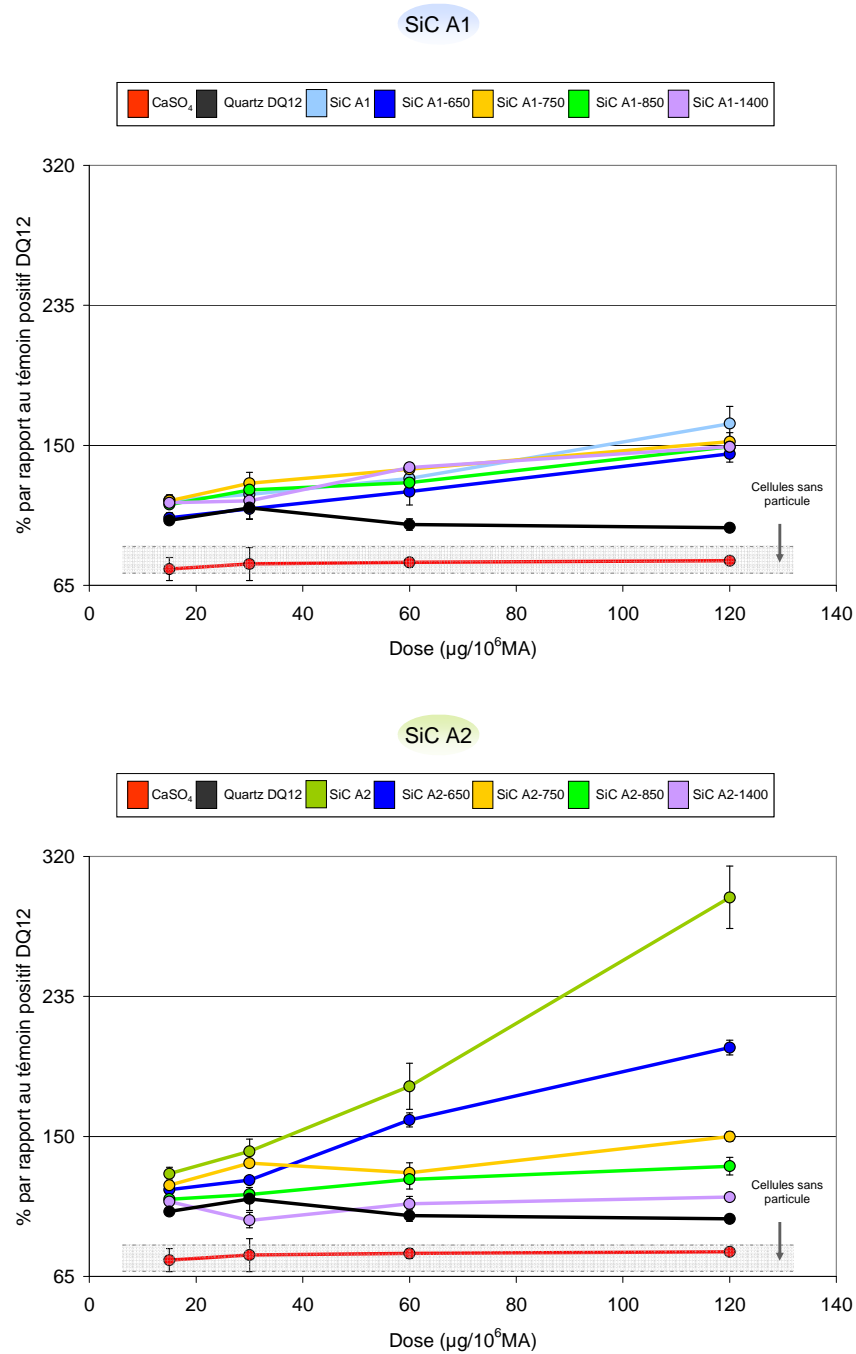
- *Stress oxydant aigu (ROS)* : Après une interaction cellule/particule de 90 minutes, les résultats obtenus n'indiquent pas de différence significative d'activité biologique entre les particules oxydées et non oxydées (Figure 92).



**Figure 92 : Stress oxydant aigu (ROS) des macrophages après 90 minutes de contact avec les particules oxydées de SiC A1 et A2**

Le stress oxydant à court terme demeure modéré voire faible pour les particules oxydées de SiC A1 avec des valeurs ( $50 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA} \leq n\text{H}_2\text{O}_2 \leq 70 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ ) comprises entre les témoins négatif et positif de toxicité. De la même façon, il n'y a pas de changement significatif pour les particules oxydées de SiC A2 ( $n\text{H}_2\text{O}_2 \geq 200 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ ). Les modifications de surface n'ont pas d'implication sur le stress oxydant à court terme.

- *Stress oxydant chronique (TOX)* : Après une interaction cellule/particule de 24 heures, le stress oxydant à long terme est évalué (Figure 93).



**Figure 93 : Stress oxydant chronique (TOX) des macrophages après 24h de contact avec les particules oxydées de SiC A1 et A2**

- **Particules A1 :**

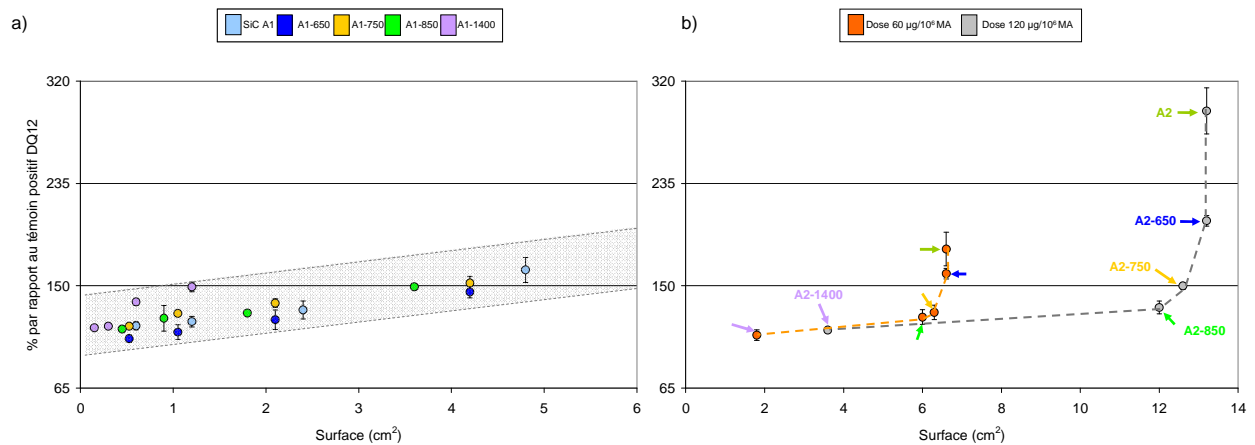
A long terme, aucune différence significative n'est observée entre les particules oxydées et non oxydées, avec un niveau de stress significatif ( $\approx 150\%$ ) pour l'ensemble des échantillons.

▪ Particules A2 :

A partir du niveau initial très significatif des particules non oxydées ( $\approx 300\%$ ), on observe une diminution progressive du signal avec le traitement thermique oxydant pour atteindre des valeurs voisines de celles du témoin positif toxicité : le quartz DQ12 ( $= 100\%$ ).

Dans ce cas précis nous noterons que le signal se rapproche de celui des silices cristallines en atteignant même les valeurs de l'échantillon de Quartz DQ12 pour les particules dont la surface est recouverte par de la cristobalite.

Comme au chapitre précédent (ChapIV, 3.3), la surface joue un rôle important dans le stress oxydant (Figure 94).



**Figure 94 : Influence de la surface des particules sur le stress oxydant chronique (a) pour les particules A1 (b) pour les particules A2 : observation de la diminution du signal avec le traitement thermique pour une dose donnée**

A dose constante, pour les particules A2, l'activité biologique diminue lorsque la surface diminue, confirmant les résultats obtenus au chapitre précédent (ChapIV, 3.3). Le signal observé après un traitement thermique oxydant à 1400°C semble correspondre à celui observé pour les particules de quartz DQ12, témoin positif de toxicité.

Ainsi, les différences de comportement des poudres à l'oxydation entre A1 et A2 se traduisent par des différences au niveau de l'activité biologique.

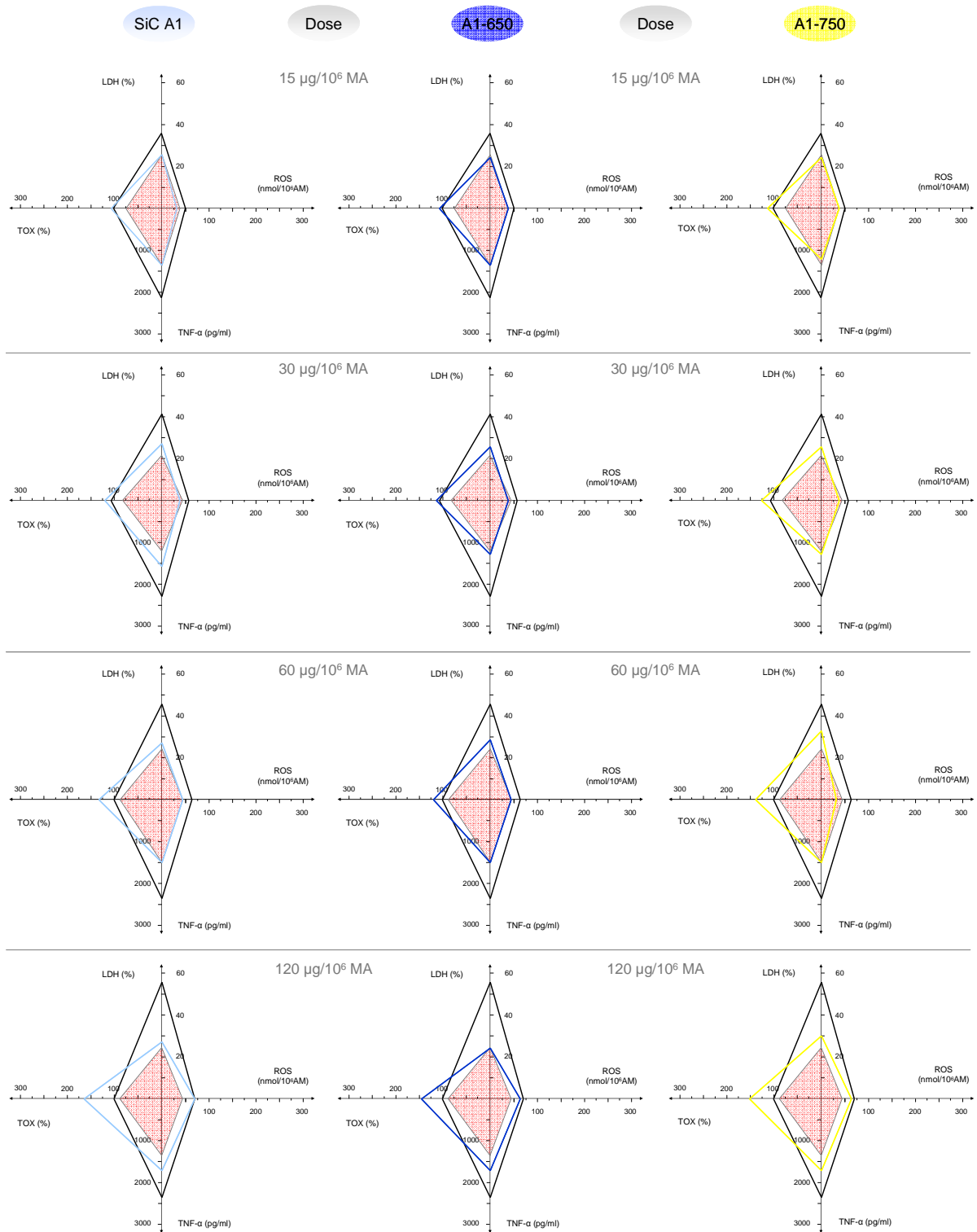
- les particules A1 sont les plus difficilement oxydables. Les poudres oxydées ne présentent pas de différences d'activité biologique avec les particules de référence.

- les particules A2, s'oxydent plus facilement et des différences très importantes sur l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ) et la mort cellulaire (LDH) sont observées.

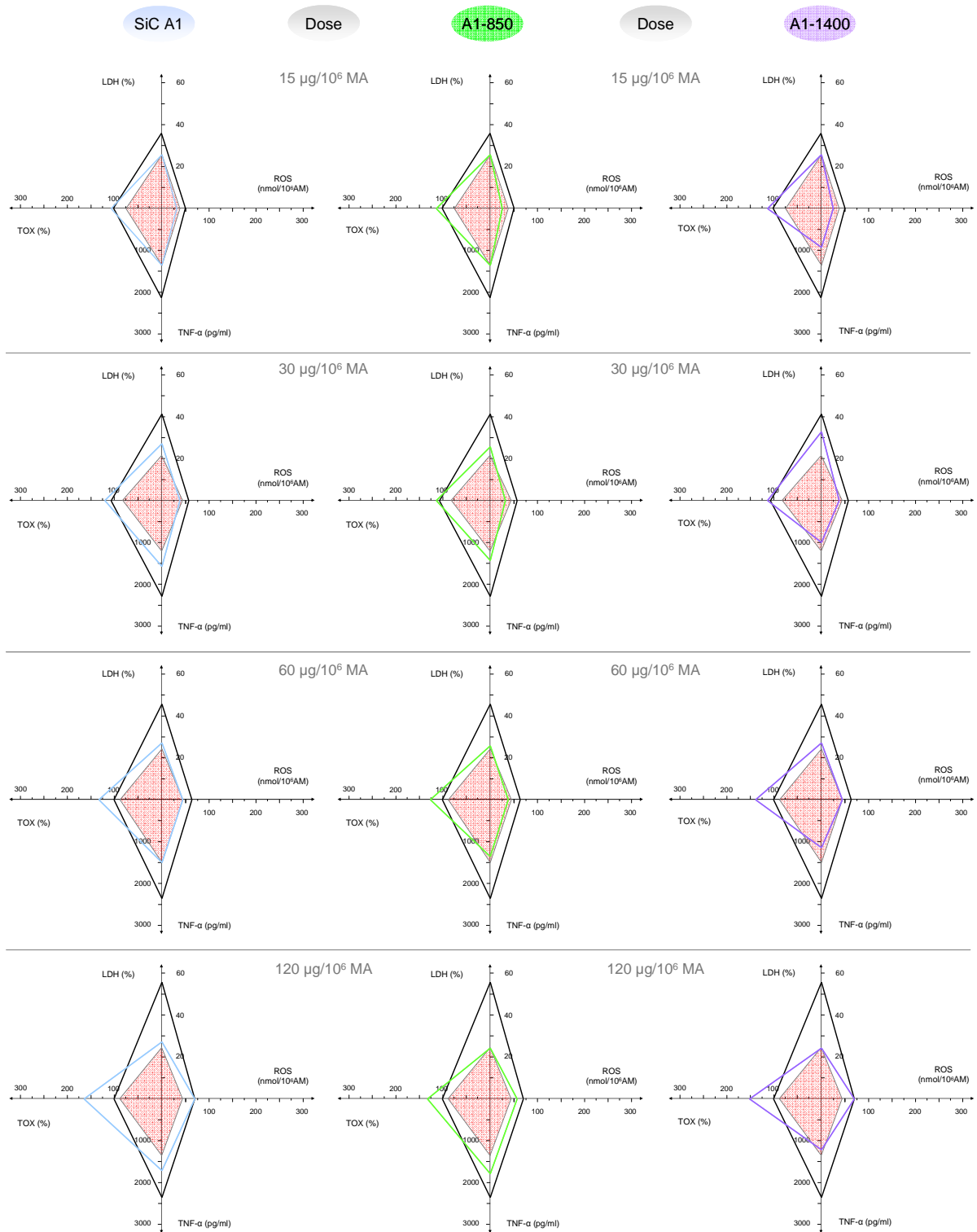
Les changements de surface des particules semblent avoir une forte implication sur l'intensité de la réponse cellulaire suivant les particules étudiées.

### **1.3.2. Activité biologique globale**

L'évolution de l'activité biologique globale des particules oxydées permet de suivre le comportement général des particules et d'établir des comparaisons entre ces dernières.



**Figure 95 : Evolution de l'activité biologique globale de particules industrielles de SiC A1 ayant subi un traitement thermique oxydant (2 heures/air) respectivement à 650°C et 750°C par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport au témoin négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**



**Figure 96 : Evolution de l'activité biologique globale de particules industrielles de SiC A1 ayant subi un traitement thermique oxydant (2 heures/air) respectivement à 850°C et 1400°C par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport au témoin négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**

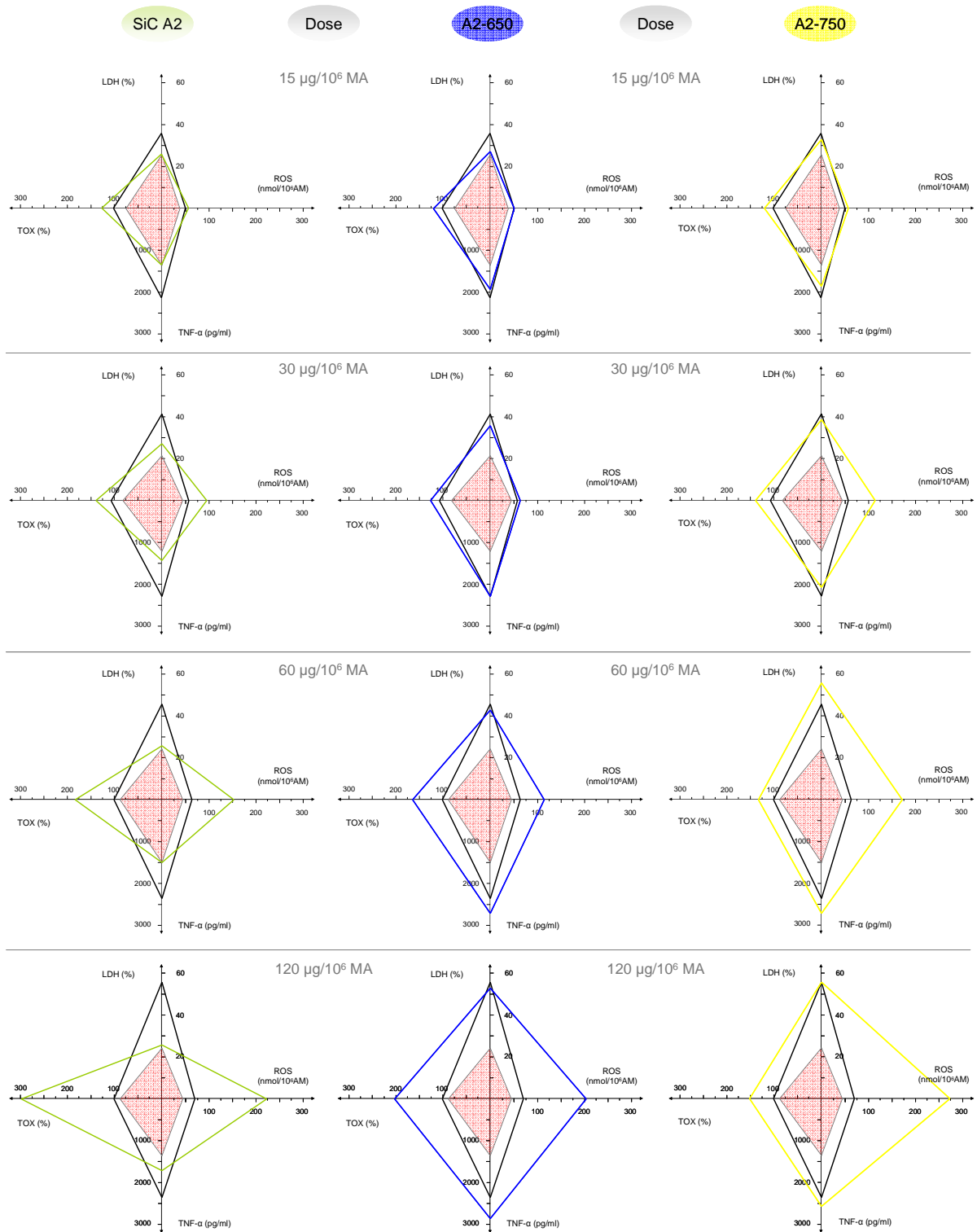
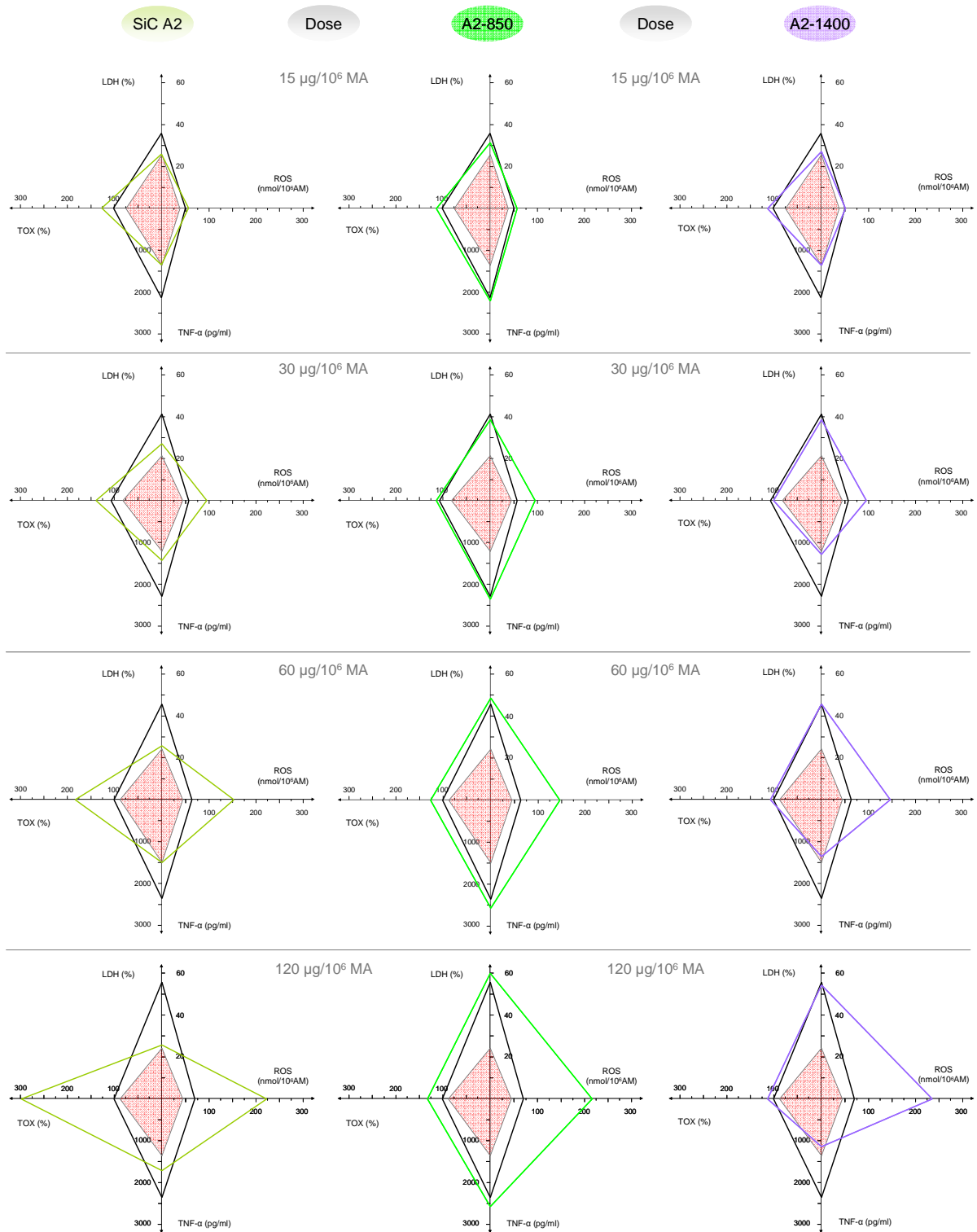


Figure 97 : Evolution de l'activité biologique globale de particules industrielles de SiC A2 ayant subi un traitement thermique oxydant (2 heures/air) respectivement à 650°C et 750°C par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport au témoin négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité





**Figure 98 : Evolution de l'activité biologique globale de particules industrielles de SiC A2 ayant subi un traitement thermique oxydant (2 heures/air) respectivement à 850°C et 1400°C par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport au témoin négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**

Les résultats du modèle vecteur soulignent des différences d'activité biologique entre les particules oxydées et non oxydées.

➤ Particules de SiC A1 (Figure 95, Figure 96) :

A l'exception d'une sensible baisse de l'activité biologique globale des particules oxydées à haute température, il n'y pas de différence notable pour l'ensemble des particules oxydées.

➤ Particules de SiC A2 (Figure 97, Figure 98) :

Les particules oxydées à basse température conduisent à une augmentation de l'activité biologique globale. On note également une sensible diminution de ce signal pour les particules oxydées à haute température par rapport aux particules non oxydées.

Cette étude met en évidence des différences d'activité biologique entre des particules de même nature chimique mais de propriétés physico-chimiques différentes soulignant la nécessité d'étudier l'activité biologique de particules toujours en rapport avec leurs propriétés physico-chimiques.

## 2. Discussion

### ➤ *Caractérisation physico-chimique*

Les particules de SiC sont recouvertes par une couche superficielle de silice (ChapIV, 2.2.3). Avec le traitement oxydant, cette couche de SiO<sub>2</sub> s'épaissit avec une augmentation du taux d'oxygène sur les premiers nanomètres et une diminution du carbone libre initialement présent en surface des grains de SiC. Dès les basses températures, l'oxygène migre au travers de la couche d'oxyde vers l'interface SiC/SiO<sub>2</sub> pour y réagir avec SiC (Costello et Tressler, 1986 ; Zheng et al., 1990 ; Quanli et al., 2007). La couche d'oxyde cristallise lorsque les conditions le permettent, à partir de 1100°C-1200°C.

Ces modifications de la surface s'accompagnent de changements morphologiques significatifs principalement à haute température avec une diminution de la surface spécifique (frittage). Bien que l'on observe un comportement des poudres de SiC proche de celui des poudres de silice (action significative sur l'inflammation et la mort cellulaire), leurs surfaces respectives restent très différentes. Il est donc peu probable de retrouver le même signal pour les poudres de SiC et les silices cristallines.

Un recuit à basse température semble diminuer l'activité radicalaire des particules de SiC. Une hypothèse possible est l'oxydation du fer II en fer III moins actif, qui augmente à nouveau lorsqu'il se trouve dans un réseau ordonné de silice cristallisée à haute température (Fubini, 2007). On peut noter un effet de surface qui masque une baisse significative du signal RPE pour les particules oxydées à haute température.

### ➤ *Caractérisation de l'activité biologique*

- Les particules de SiC A1 ne montrent pas de grands changements après traitement thermique oxydant. Les résultats des tests *In Vitro* confirment une activité biologique : modérée sur l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ), nulle en cytotoxicité (LDH) et significative sur le stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

- Les particules de SiC A2 présentent une activité très importante après traitement thermique à basse température principalement sur l'état inflammatoire (TNF- $\alpha$ ) et la mort cellulaire (LDH) alors que l'activité biologique initiale est respectivement modérée et nulle pour ces deux domaines. On observe une baisse significative du signal relatif au stress oxydant

chronique (TOX) qui se justifie principalement par un effet de surface et, dans une moindre mesure, par une évolution du signal vers celui des silices cristallines (Quartz DQ12).

➤ *Corrélations entre les caractéristiques physico-chimiques et l'activité biologique*

On souligne des réponses cellulaires différentes pour des particules de même nature chimique, mais de caractéristiques différentes (physico-chimiques, comportements à l'oxydation, etc.). Ces observations soulignent l'intérêt de ce type d'étude qui consiste à caractériser en parallèle les propriétés physico-chimiques et l'activité biologique des particules. De plus, il convient de prendre des précautions en évitant la généralisation des résultats à l'ensemble des particules d'une même nature chimique.

Les traitements thermiques oxydants conduisent à une déshydroxylation d'une partie des groupements silanols (Si-OH) en ponts siloxanes (Si-O-Si) (Legrand et al., 1998) modifiant la fonctionnalisation de surface des particules de SiC A2 (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques, hydrophilie, etc.) (ChapII, 4.2). L'augmentation de la réactivité des particules oxydées de SiC se caractérise probablement par l'établissement de fortes liaisons (couple acide-base de Lewis) (Fubini et al., 1992) entre les groupements en surface de ces particules (Si-OH, Si-O-Si) et ceux des protéines membranaires des cellules (tétra-alkyl ammonium des phospholipides, carboxyliques de l'acide N-acétylneuraminique, etc.).

Ces interactions peuvent altérer le fonctionnement des macrophages et conduire à leur mort prématuré (nécrose). Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus sur des poudres de silice dont les effets sur le potentiel de lyse membranaire (Fubini, 1997 ; Hemenway et al., 1993) et la cytotoxicité (Fubini et wallace, 1999) ont été mis en évidence.

De manière générale, à haute température, la morphologie spécifique des particules de SiC semble être le paramètre principal conduisant à une baisse de l'activité biologique.

Cette interprétation des résultats peut servir de base pour des études complémentaires afin d'identifier le type de mort cellulaire (apoptose/nécrose) et la nature des interactions particules/cellules. Ainsi, nous pourrions mieux appréhender les paramètres qui conduisent à l'augmentation significative de l'état inflammatoire et de la mort cellulaire après oxydation des surfaces des particules de SiC A2.

### 3. Conclusion

L'utilisation de traitement thermique oxydant a permis de modifier la surface des particules de SiC et l'évaluation de l'activité biologique de souligner des différences entre les particules étudiées (Tableau 16).

	Paramètres	A1	A1 650	A1 750	A1 850	A1 1400	A2	A2 650	A2 750	A2 850	A2 1400
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	+	+	+	+	—	+	+++	+++	+++	—
Mort cellulaire	LDH	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++

Nomenclature	
—	Nul
+	Modéré
++	Significatif
+++	Très significatif
++++	Extrêmement significatif

**Tableau 16 : Résumé de l'activité biologique des particules oxydées de SiC**

A l'exception d'une sensible diminution de l'activité biologique pour les particules oxydées à haute température (TNF- $\alpha$ ), celle-ci est stable pour les particules oxydées A1 et augmente significativement pour les particules oxydées A2. Néanmoins, l'ensemble des particules oxydées conserve leur capacité propre à générer des radicaux libres extrêmement réactifs (HO•, COO•).

L'état de surface des particules (nature des groupements de surface, taux d'oxygène, cristallinité) fait de la surface un paramètre clef de l'activité biologique globale des particules de SiC (activité radicalaire, stress oxydant, état inflammatoire, mort cellulaire). En effet, cette fonctionnalisation de surface semble déterminer la nature des interactions particules/cellules qui conditionne la réponse cellulaire.

En perspective, l'étude de la nature de la couche de silice à basse température (cristallinité, nature des liaisons), de l'interaction particule/milieu (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques, hydrophilie, etc.) et particule/cellule (groupements chimiques en surfaces des particules et des membranes cellulaires impliqués) peut apporter des réponses plus exhaustives. Cette approche pluridisciplinaire peut permettre de mieux identifier les paramètres physico-chimiques impliqués dans la réponse cellulaire.

## CHAPITRE VI :

# RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

## - NANOPARTICULES DE SiC-

La tendance du marché à évoluer vers le domaine nanométrique ouvre des perspectives exceptionnelles pour les industriels avec de vastes champs d'applications : matériaux céramiques, composites, domaine électronique, médical, etc. Dans cette partie, nous souhaitons aborder le problème spécifique des nanoparticules en étudiant des nanopoudres de SiC synthétisées par différentes méthodes (pyrolyse laser, voie sol-gel) afin d'en évaluer l'activité biologique. Nous procéderons de la façon suivante :

- Dans un premier temps, nous allons effectuer un bref rappel sur l'origine de ces nanoparticules en présentant brièvement les méthodes utilisées pour les synthétiser, à savoir la pyrolyse laser et la voie sol-gel.
  
- Dans un second temps, nous réaliserons la caractérisation de ces nanoparticules pour en dégager les principales propriétés physico-chimiques (taille, surface, morphologie, chimie, structure cristalline, état de surface, activité radicalaire).
  
- Dans un troisième temps, nous évaluerons l'activité biologique de ces nanoparticules au contact de macrophages via des tests *In Vitro* (état d'inflammation, mort cellulaire, stress oxydant).

Enfin, nous discuterons des résultats en replaçant cette étude dans le contexte des poudres de SiC (Chap IV et V). L'objectif est de pouvoir donner une estimation de la toxicité globale des nanoparticules de SiC dont les potentialités exceptionnelles rendent leur développement à grande échelle imminent (Chap I, 5).

## 1. Les nanoparticules de SiC

Conformément à notre démarche expérimentale et pour anticiper le problème de santé lié aux nanoparticules de SiC, nous allons évaluer la toxicité de ce type de particules à titre exploratoire faisant de ce travail, un des premiers réalisés à ce jour sur l'évaluation de l'activité biologique de nanoparticules de SiC. Dans cette partie, cinq nanopoudres synthétisées par voie laser (LP1, LP2, LP3, LP4 et LP5) et une par voie sol-gel (SG) sont étudiées.

### 1.1. Nanoparticules LP (pyrolyse laser)

La pyrolyse laser est une méthode qui repose sur l'interaction en jets croisés entre un faisceau laser au CO<sub>2</sub> et un flux de réactifs : SiH<sub>4</sub> (source de silicium)/C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (source de carbone) pour la synthèse des nanopoudres de SiC (Figure 13). Le transfert d'énergie résonnant provoque une élévation rapide de température dans la zone de réaction par excitation des niveaux vibrationnels des molécules. Les précurseurs sont alors dissociés et une flamme apparaît dans laquelle se forment les nanoparticules de SiC. Les poudres sont ensuite refroidies par un effet de trempe et entraînées par un flux gazeux dans une zone où elles sont collectées. La maîtrise du dispositif de synthèse permet principalement de contrôler la stœchiométrie des poudres obtenues (pression et/ou rapport entre le flux de réactifs SiH<sub>4</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), la taille des particules (temps de résidence dans le réacteur) et l'état de cristallinité (puissance du faisceau laser) (Fantoni et al., 1990 ; Boucle, 2004 ; Leconte et al., 2007 ; Herlin-Boime et al., 2008).

Ainsi, cinq nanopoudres de SiC ont été synthétisées en partenariat avec le laboratoire du CEA\* Saclay, notées LP1, LP2, LP3, LP4 et LP5 :

- LP1 est une nanopoudre de SiC « classique » obtenue dans les conditions standard de synthèse de la pyrolyse laser.
- LP2 et LP3 sont des nanopoudres synthétisées en modifiant les paramètres de synthèse (pression et réglage du flux de réactifs SiH<sub>4</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) afin d'obtenir des nanopoudres avec un excès respectivement de carbone et de silicium.
- LP4 est une nanopoudre élaborée en augmentant le temps de résidence des particules dans la zone chaude (retrait de la lentille de focalisation du laser) favorisant ainsi la croissance des grains (Cauchetier et al., 1988 ; Tougne et al., 1993).

---

\* CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique.

- LP5 est synthétisée dans les mêmes conditions opératoires que LP4 mais avec une puissance du laser très supérieure à celle habituellement utilisée pour les autres nanoparticules dans le but de modifier la cristallinité de ces particules (Fantoni et al., 1990).

Parmi les avantages de cette technique, on peut citer la réaction en flux, une grande pureté chimique des produits et une bonne homogénéité physique et chimique. Ceci fait de cette méthode l'une des plus avancées, à ce jour, pour la production future de masse de nanoparticules de SiC (Herlin-Boime et al., 2002 ; Boucle et al., 2005 ; Leconte et al., 2007).

## 1.2. Nanoparticules SG (sol-gel)

La synthèse classique par voie sol-gel s'effectue à partir d'alkoxydes de silicium de formule  $\text{Si}(\text{OR})_n$  où R est un groupement alkyle. Le principe repose sur une succession de réactions d'hydrolyse-condensation conduisant à la formation d'un gel (ChapI, 5.3), pouvant être traité thermiquement par la suite. Nous avons ainsi réalisé la synthèse d'une nanopoudre de SiC (SiC SG) dans l'eau à partir des précurseurs suivant : PTES (phenyl-triethoxy silane) et TEOS (triethoxy silane) (Chap I, Figure 14). Après 24h à 20°C, le gel est récupéré et séché dans une étuve (60°C/48h). Finalement, un traitement thermique sous argon à 1500°C est réalisé pour assurer la réduction carbothermique de la silice par le carbone des groupements organiques (Hatakaeyama et Kanzaki, 1990 ; Seog et Kim, 1993).



## 2. Propriétés physico-chimiques

Les nanopoudres de SiC (LP1, LP2, LP3, LP4, LP5 et SG) ont été entièrement caractérisées pour en déterminer les principales propriétés (caractéristiques physico-chimiques, activité radicalaire).

### 2.1. Principales caractéristiques des nanoparticules de SiC

#### ➤ Taille et surface

Les résultats des analyses élémentaires effectuées sur les poudres brutes sont présentés dans le Tableau 13. Les surfaces spécifiques des nanopoudres de SiC sont évaluées par la méthode BET. Les diamètres BET correspondants sont estimés à partir des masses volumiques correspondantes évaluées par pycnométrie à hélium (Boucle, 2004).

	Surface spécifique ( $S_p$ en $m^2/g$ )	Diamètre BET équivalent ( $D$ en nm)	Masse volumique ( $\rho$ en $g/cm^3$ )
SiC LP1	$\approx 139$	14	3,2
SiC LP2	$\approx 125$	15	3,1
SiC LP3	$\approx 140$	14	3,0
SiC LP4	$\approx 52$	37	3,1
SiC LP5	$\approx 33$	59	3,1
SiC SG	$\approx 125$	15	3,2

**Tableau 17 : Surfaces spécifiques, diamètres équivalents et masses volumiques des nanopoudres de SiC**

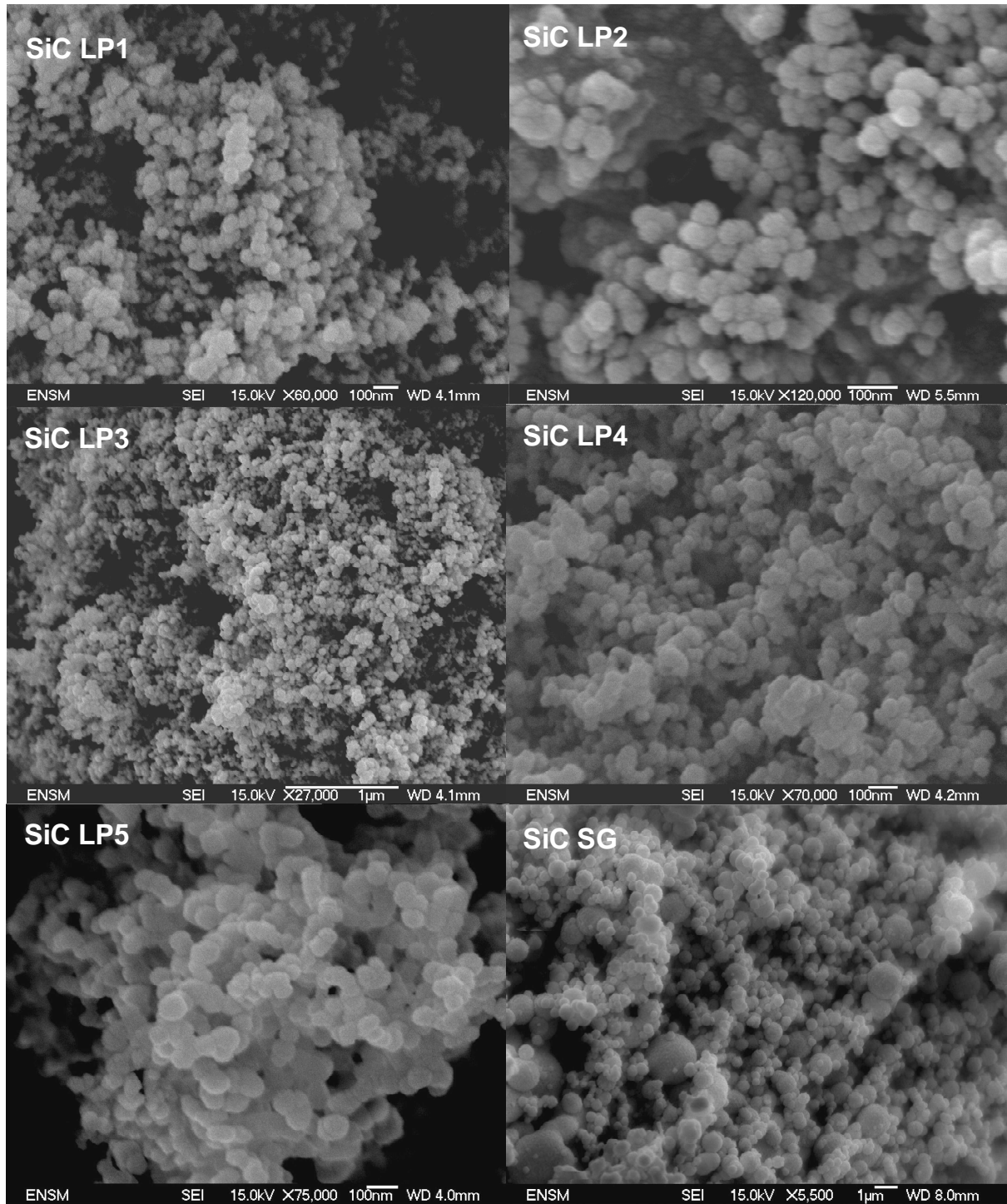
La masse volumique des nanopoudres de SiC est dans tous les cas proche de la masse volumique théorique du SiC massif ( $\rho = 3,2 \text{ g/cm}^3$ ). Le calcul des tailles moyennes des grains est issu de l'analyse BET en prenant en compte la masse volumique des poudres et en supposant que les particules soient sphériques (Figure 49). Cette méthode est couramment utilisée pour le calcul théorique de ce type de particules nanométriques, à partir de la relation suivante :

$$S_p = \frac{6}{\rho \cdot D}$$

Les nanopoudres obtenues dans les conditions standards (LP1, LP2, LP3 et SG) présentent en général des surfaces spécifiques importantes de l'ordre d'une centaine de mètre carré par gramme ( $Sp \geq 125 \text{ m}^2/\text{g}$ ). La mesure de surface spécifique révèle l'influence des paramètres de synthèse sur la morphologie des nanopoudres avec une augmentation de la taille des grains de SiC lorsqu'on prolonge le temps de séjour des particules dans le réacteur (SiC LP4 et LP5). On obtient alors des surfaces spécifiques 3 à 5 fois moins importantes que les poudres élaborées dans les conditions standards ( $Sp \approx 30$  et  $50 \text{ m}^2/\text{g}$ ) en accord avec les études bibliographiques (Cauchetier et al., 1988 ; Tougne et al., 1993).

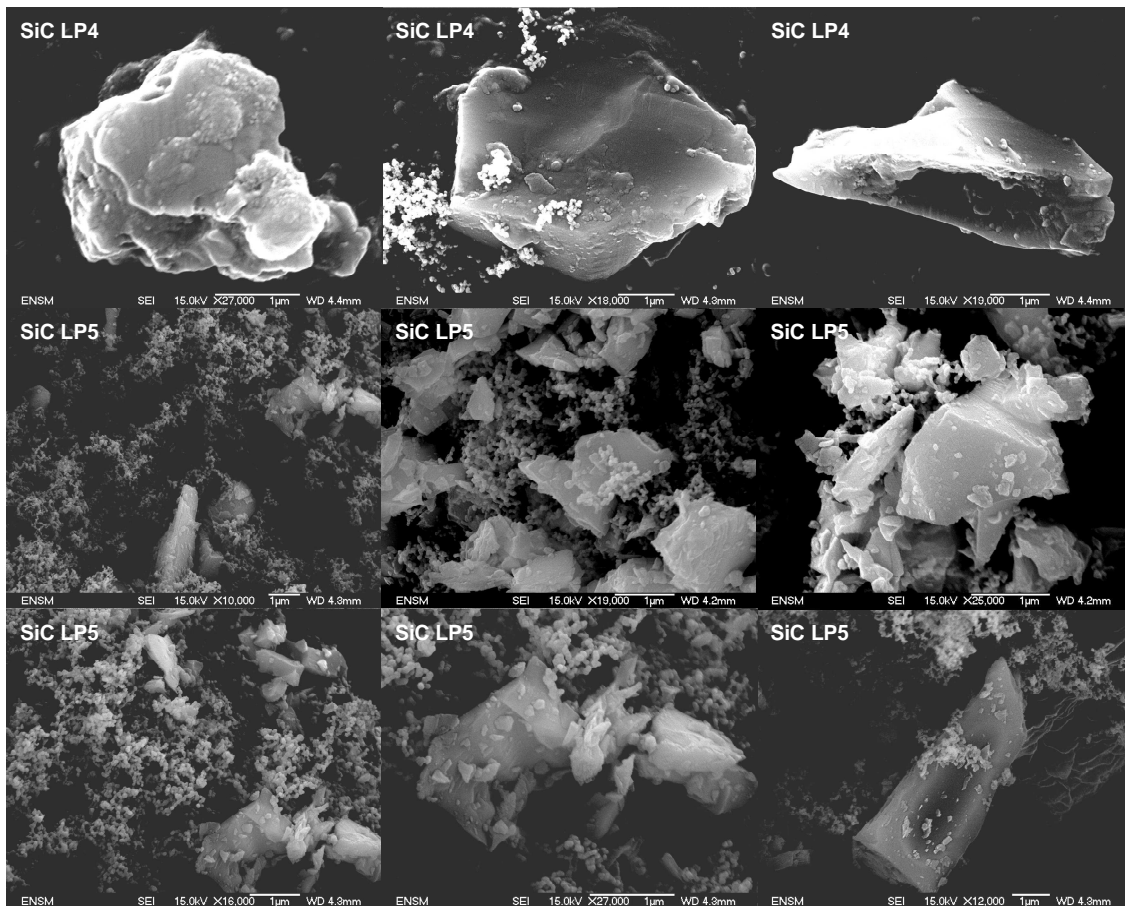
➤ *Morphologie des nanoparticules*

Les observations en microscopie électronique au MEB-FEG nous permettent d'obtenir des informations sur la taille, la forme et l'aspect de surface des nanoparticules de SiC (Figure 49). Celles-ci sont principalement caractérisées par une morphologie sphérique caractéristique de ces voies de synthèse par pyrolyse laser et voie sol-gel. Bien que la majorité des grains soit de taille nanométrique ( $D \leq 100 \text{ nm}$ ) on observe toujours dans ces échantillons des particules submicroniques ( $100 \text{ nm} \leq D \leq 1000 \text{ nm}$ ).



**Figure 99 : Images MEB-FEG des nanoparticules de SiC obtenues par pyrolyse laser (SiC LP1, LP2, LP3, LP4 et LP5) et par voie sol-gel (SiC SG)**

On peut souligner la présence de particules grossières de formes aléatoires au sein des échantillons LP4 et LP5 (Figure 100) caractérisées par des tailles de particules plus importantes (1 à 2  $\mu$ m) qui ressemblent aux morphologies de certaines particules fines industrielles de SiC (A2, A5).



**Figure 100 : Images MEB-FEG de particules grossières retrouvées dans les nanopoudres de SiC LP4 et LP5 en augmentant le temps de séjour des particules dans le réacteur de pyrolyse pour en favoriser la croissance**

En effet, en augmentant le temps de séjour dans la zone chaude, on favorise la croissance des grains et de possibles réactions de frittage. Ces deux nanopoudres LP4 et LP5 présentent donc des particules de tailles plus importantes avec quelques particules grossières (Figure 100).

L'aspect général des nanoparticules est typique de ces voies de synthèse par pyrolyse laser (Tougne et al., 1993 ; Bouclé, 2004 ; Leconte et al., 2007) et voie sol-gel (White et al., 1987 ; Hatakaeyama et Kanzaki, 1990 ; Seog et Kim, 1993). Les particules sont principalement sphériques de taille nanométrique avec de grandes surfaces (en général  $Sp \geq 100 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Seules les particules LP4 et LP5 ( $Sp \leq 50 \text{ m}^2/\text{g}$ ), pour lesquelles on favorise la croissance des grains de SiC en augmentant le temps de séjour dans le réacteur de pyrolyse laser, contiennent des particules grossières dont certaines peuvent présenter des formes très irrégulières.

➤ *Analyse cristallographique*

D'après les diffractogrammes des nanoparticules de SiC (Figure 101), l'analyse de la structure cristallographique des particules révèle principalement la présence du polytype cubique (3C). On peut noter la présence dans certaines nanopoudres (LP4, LP5 et SG) du polytype hexagonal 6H de façon minoritaire ( $\%SiC-6H \leq 10\%$ ) correspondant à l'épaulement situé à  $2\theta = 34,1^\circ$ . On peut également observer une fraction cristallisée de la phase excédentaire de silicium ( $\%Si \leq 2\%$ ) pour l'échantillon SiC LP5.

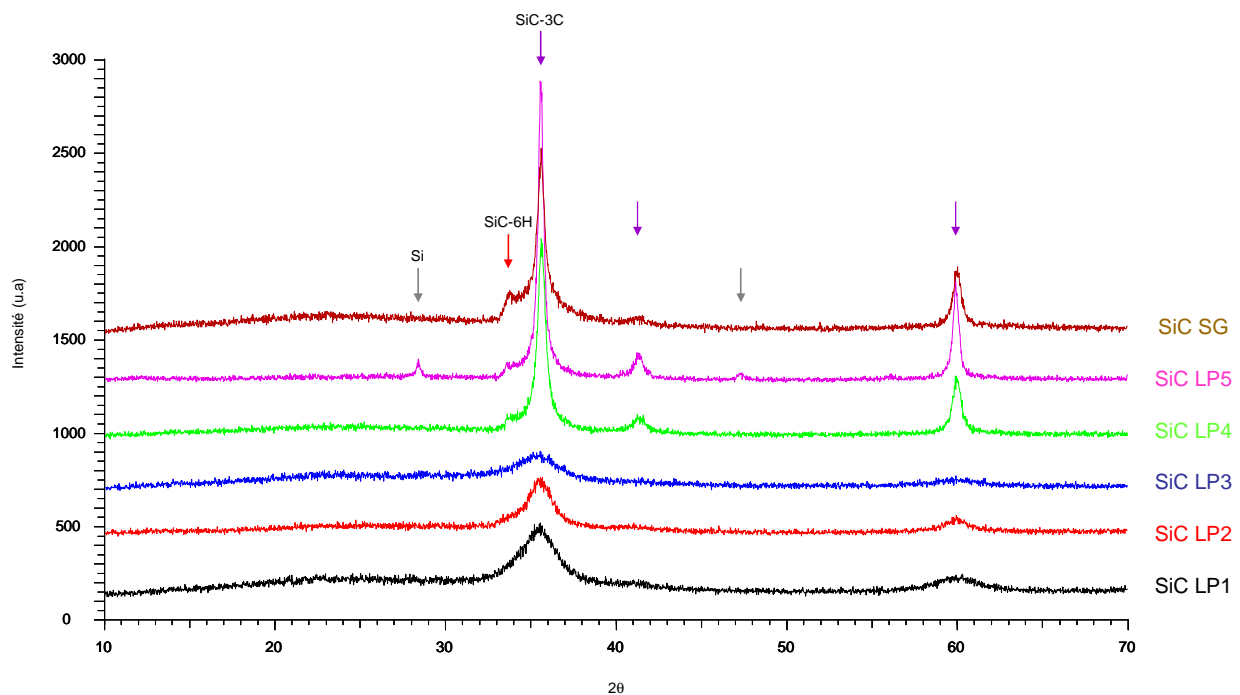
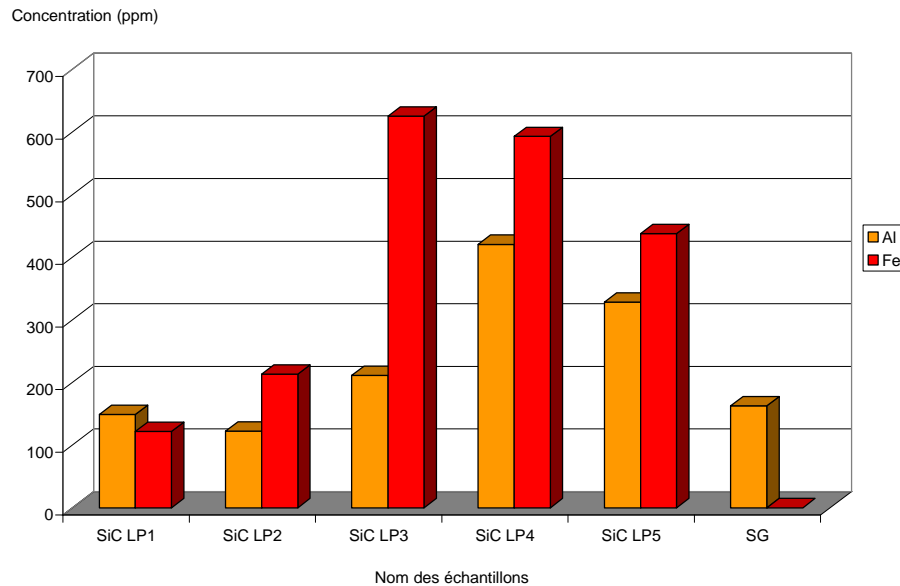


Figure 101 : Allure du diffractogramme des nanopoudres de SiC

Par ailleurs, la largeur à mi-hauteur des raies est liée à trois composantes dont l'appareillage, la taille des cristallites et les microdistorsions. Ainsi, en prenant en compte ces paramètres (Warren et Averbach, 1952), nous pouvons estimer la taille des cristallites à partir de l'élargissement des raies de diffraction en utilisant la loi de Scherrer (Birks et Friedman, 1946). Les tailles de cristallites sont estimées à environ 3 à 5 nm pour les particules LP1, LP2 et LP3 alors que ces valeurs augmentent pour les nanoparticules LP4, LP5 et SG avec respectivement des tailles de cristallites de 16, 26 et 14 nm (Bouclé, 2004). Néanmoins d'autres contributions peuvent intervenir, comme celle de défauts d'empilements ou de zones à caractère désordonné. Ces observations sont en accord avec celles habituellement observées sur ce type de poudres (Herlin-Boime et al., 2002 ; Bouclé, 2004 ; Leconte et al., 2007).

➤ *Composition chimique*

Les résultats de l'analyse chimique indiquent la présence d'impuretés (Fe, Al) dans les nanopoudres (Figure 53). L'ensemble des nanoparticules présente de faibles proportions en fer ( $\%Fe \leq 600$  ppm) et en aluminium ( $\%Al \leq 400$  ppm).



**Figure 102 : Concentration des impuretés métalliques de fer et d'aluminium contenues dans les nanopoudres de SiC**

Les teneurs en oxygène (% massique) correspondent à celles habituellement observées pour les nanopoudres avec des valeurs significatives ( $1,5 \leq \%O \leq 4,6$ ) (Tableau 14).

Echantillon	% O	C/Si at.
SiC LP1	2,8	1,00
SiC LP2	2,1	1,21
SiC LP3	4,6	0,81
SiC LP4	1,5	0,88
SiC LP5	2,2	0,88
SiC SG	2,1	0,88

**Tableau 18 : Compositions chimiques des nanopoudres de SiC**

La poudre LP1 est stœchiométrique ( $C/Si \approx 1$ ) à l'image des nanopoudres de SiC standards obtenues par pyrolyse laser (Leconte et al., 2007). Conformément au mode de production

(ChapVI, 1.1), la poudre LP2 présente un excès de carbone ( $C/Si \approx 1,21$ ) alors que les poudres LP3, LP4, LP5 et SG présentent un excès de silicium ( $C/Si \leq 0,9$ ). On peut souligner en général des difficultés à atteindre la stœchiométrie pour les nanopoudres obtenues par voie sol-gel car il reste délicat de contrôler avec précision la nature chimique du gel lors de cette réaction (quantité de groupes carbonés, rendement, etc.).

➤ *Etat de surface des poudres*

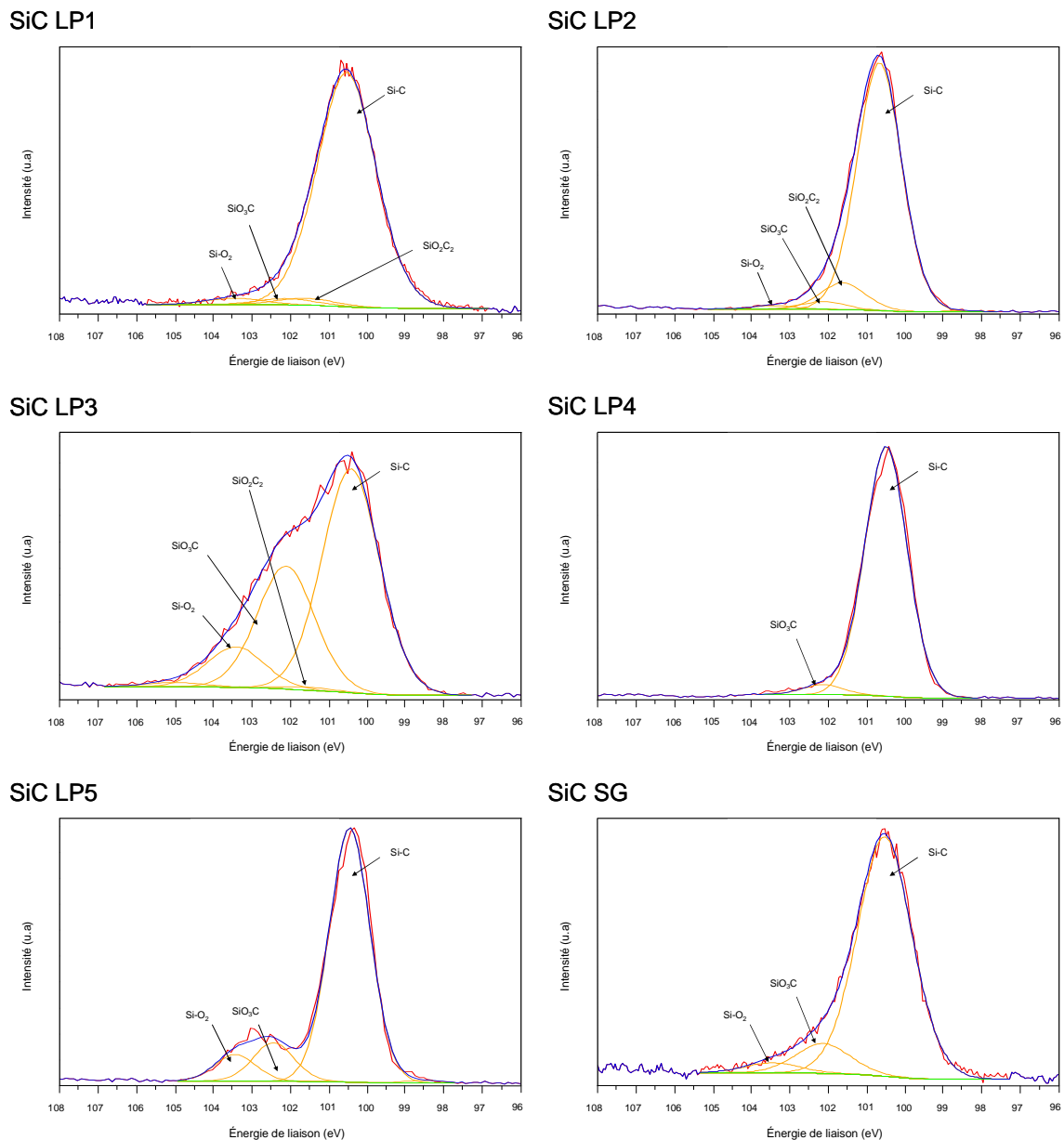
Le pourcentage atomique et les informations relatives à la décomposition spectrale des différents signaux  $Si_{2p}$ ,  $O_{1s}$  et  $C_{1s}$  sont répertoriés dans le Tableau 15.

		Echantillons					
		SiC LP1	SiC LP2	SiC LP3	SiC LP4	SiC LP5	SiC SG
Pourcentage atomique (%)	$Si_{2p}$	50	45	45	49	48	38
	$C_{1s}$	42	48	41	43	30	54
	$O_{1s}$	8	7	14	8	22	8
Principale composition des pics	$Si_{2p}$	Si-C, Si-O <sub>2</sub> , SiO <sub>3</sub> C, SiO <sub>2</sub> C <sub>2</sub>					
	$C_{1s}$	C-Si, C-C, Si-O <sub>x</sub> C <sub>y</sub> , C-O, C=O					
	$O_{1s}$	O <sub>2</sub> -Si, Si-O <sub>x</sub> C <sub>y</sub>					

**Tableau 19 : Pourcentage atomique et principale composition de surface des nanopoudres de SiC**

D'après ces analyses, le pourcentage d'oxygène de surface sur les premiers nanomètres est très faible ( $\%O \leq 8\%$ ), contrastant de fait avec les précédentes analyses sur les particules industrielles de SiC ( $\%O \approx 17-23\%$ ). Seules les nanopoudres LP3 et LP5 présentent des valeurs similaires ( $\%O \geq 10\%$ ). Le taux de carbone dans nos échantillons est globalement similaires ( $\%C \approx 41-43\%$ ) avec une légère hausse de ce signal dans la poudre LP2 expérimentalement enrichie en carbone ( $\%C \approx 48\%$ ) et une baisse sensible dans la poudre LP5 plus oxydée ( $\%C \approx 30\%$  et  $\%O \approx 22\%$ ). Seule la poudre de SiC SG présente un taux de carbone de surface plus élevé ( $\%C \approx 54\%$ ) que pour les particules laser.

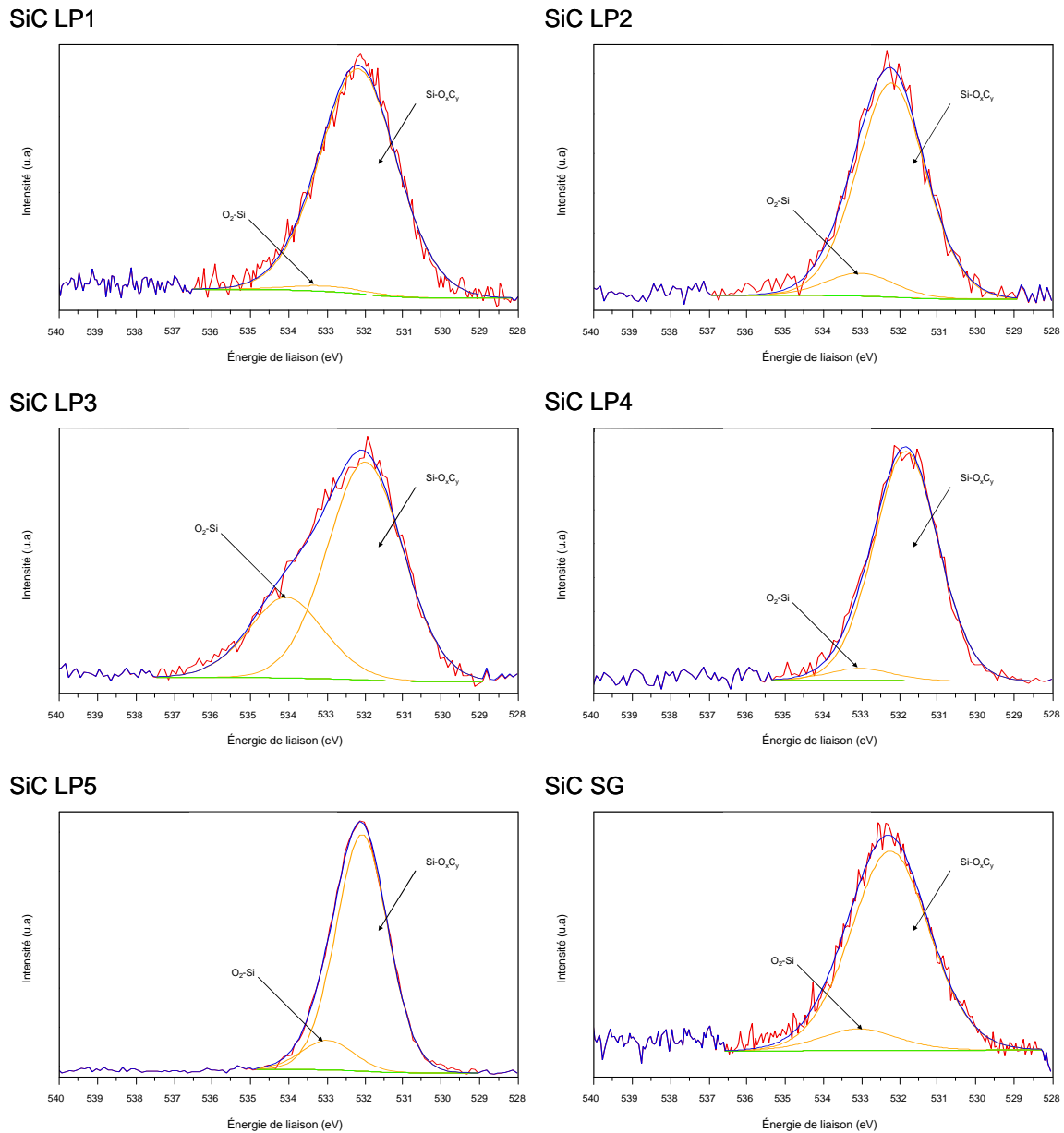
L'exploitation des décompositions spectrales des différents signaux  $Si_{2p}$ ,  $O_{1s}$  et  $C_{1s}$  nous renseigne sur l'environnement chimique des éléments de surface des nanoparticules (Figure 84, Figure 85, Figure 105).



**Figure 103 : Décomposition des spectres de photoémission du niveau de cœur  $\text{Si}_{2p}$  observés par analyse de la surface de nanopoudres de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP) et par voie sol-gel (SiC SG)**

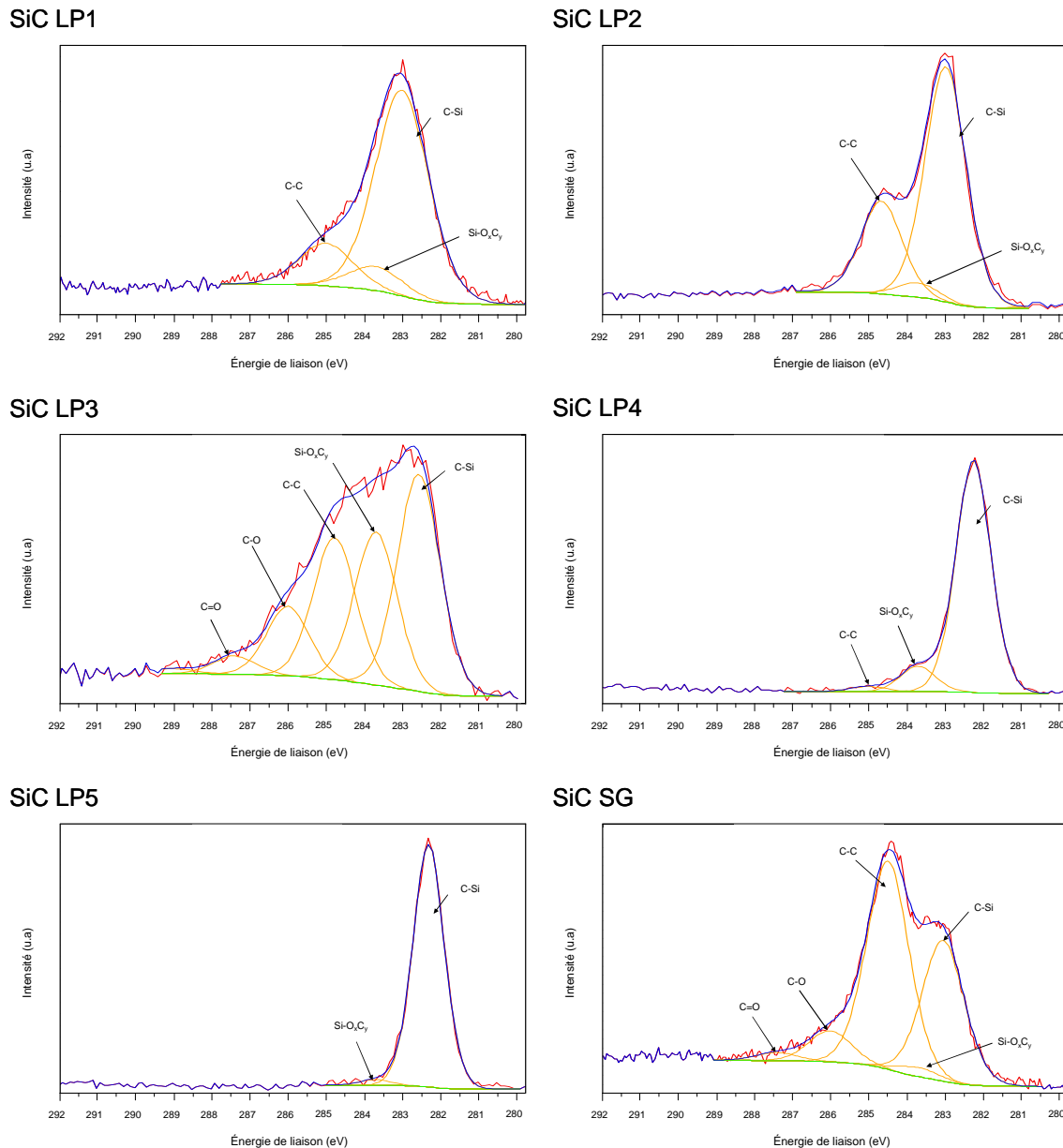
Les signaux du pic  $\text{Si}_{2p}$  présentent des ressemblances pour les nanoparticules LP1, LP2, LP4 et SG avec des signaux nets composés principalement de SiC (liaison Si-C), d'oxycarbure de silicium (liaison Si-O<sub>x</sub>C<sub>y</sub>) et d'une très faible part relative à la silice (liaison Si-O<sub>2</sub>). Les nanoparticules semblent correspondre à des nanograins de SiC recouverts principalement par une phase d'oxydes mixtes à l'inverse des particules industrielles de SiC pour lesquelles la silice recouvrait entièrement le grain de SiC. A l'inverse, les signaux relatifs aux poudres LP3 et LP5 présentent une contribution plus significative de l'oxygène (Figure 84, Figure 85).





**Figure 104 : Décomposition des spectres de photoémission du niveau de cœur O<sub>1s</sub> observés par analyse de la surface de nanopoudres de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP) et par voie sol-gel (SiC SG)**

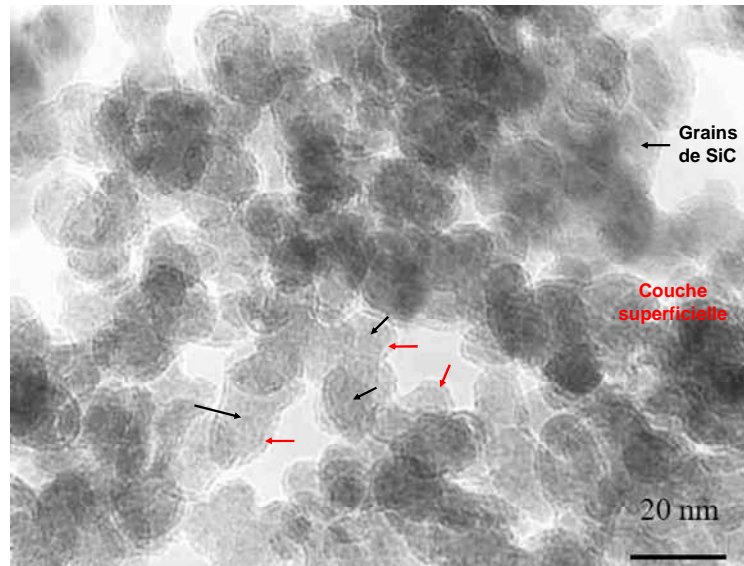
L'analyse des pics C<sub>1s</sub> souligne l'enrichissement en carbone de l'échantillon LP2 (liaison C–C) par rapport à l'échantillon LP1. La poudre LP3 enrichie en silicium, présente un excès de formes oxydées du carbone (C–O, C=O) avec une forme atypique du signal qui contraste avec l'ensemble des autres nanopoudres synthétisées par voie laser.



**Figure 105 : Décomposition des spectres de photoémission du niveau de cœur  $C_{1s}$  observés par analyse de la surface de nanopoudres de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP) et par voie sol-gel (SiC SG)**

Les pics  $C_{1s}$  relatifs aux nanopoudres LP4 et LP5 sont très « propres » avec des signaux bien définis suggérant que le carbone analysé en surface est quasi entièrement lié au silicium dans des liaisons de type Si-C. La nanopoudre de SiC SG présente un signal différent de ceux des nanoparticules LP avec une contribution significative du carbone (liaison C-C) qui s'explique probablement par la présence des résidus de groupements organiques phényles (liaisons C-C, C=C) utilisés lors de l'élaboration de ce type de poudre (Kovac et al., 1988 ; Beguin et al., 1990 ; Uchida et al., 2004).

Ces résultats sont en accord avec les observations en microscopie électronique à transmission à haute résolution (METHR) effectuées dans certaines études (Herlin-Boime et al., 2002/2008) de caractérisations physico-chimiques des nanoparticules de SiC (Figure 106).



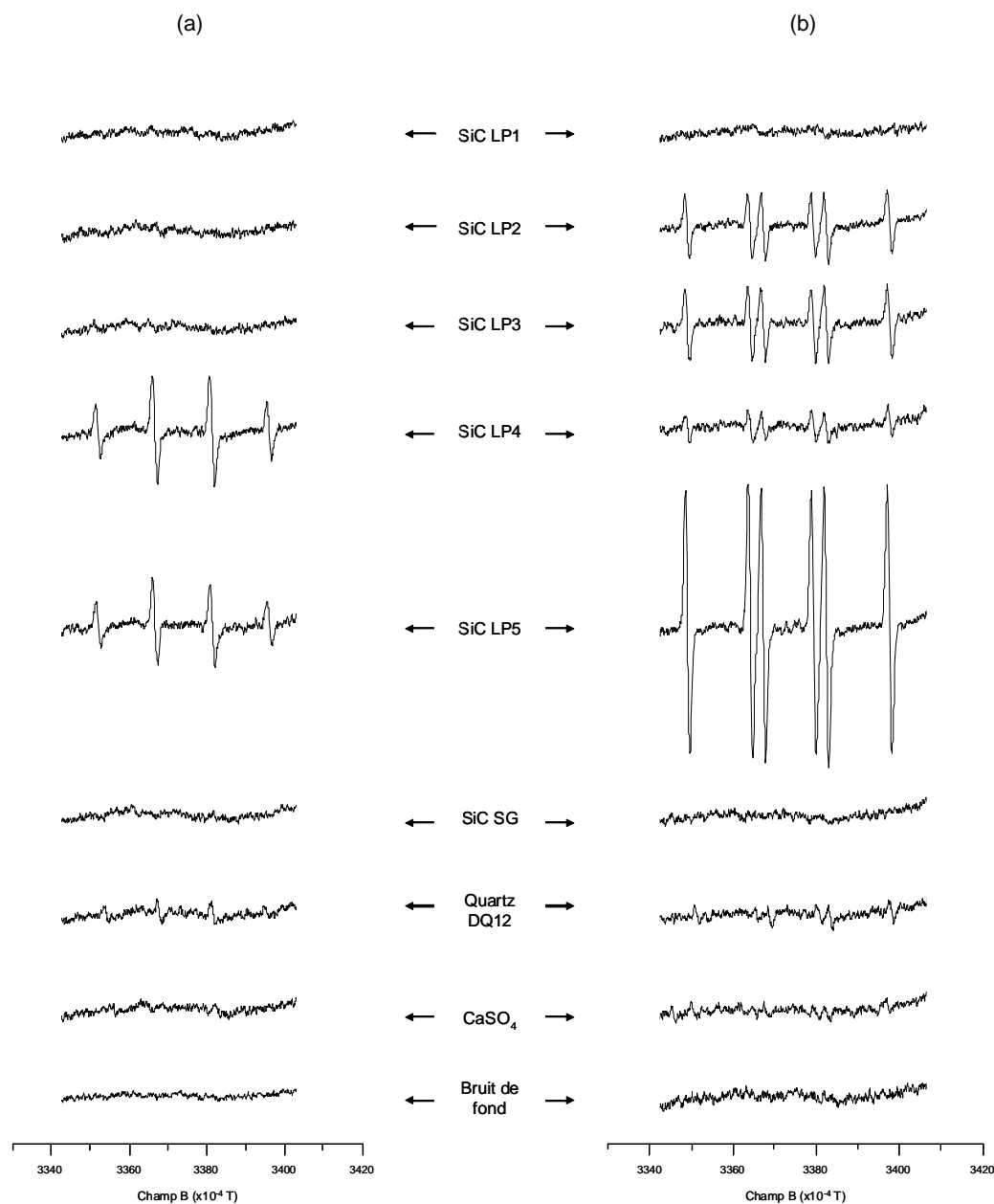
**Figure 106 : Images METHR de nanoparticules de SiC - Aspect général d'une poudre de SiC synthétisée par pyrolyse laser représentatif de la microstructure générale de ces particules (Herlin-Boime et al., 2002)**

Herlin-Boime et al. (Herlin-Boime et al., 2002/2008), observent que les grains de SiC apparaissent entourés d'une fine pellicule d'environ 2 nm d'épaisseur qu'ils attribuent à de la silice. On peut compléter ces analyses en soulignant qu'il s'agit probablement parfois de silice (LP3 et LP5) mais aussi dans certains cas d'une couche d'oxydes mixtes à l'image des nanopoudres LP1, LP2 et LP4.

En général, la surface des nanopoudres est plus « propre » que celles de poudres industrielles (Chap IV, 2.2.3) avec un faible taux d'oxygène ( $\%O \leq 8\%$ ) sur les premiers nanomètres. L'analyse de surface permet de mettre en évidence des nanograins de SiC recouverts essentiellement par une phase d'oxydes mixtes ( $SiO_xC_y$ ) et/ou de silice ( $SiO_2$ ).

## 2.2. Activité radicalaire : HO•, COO•<sup>-</sup>

L'analyse des signaux RPE caractérise la capacité des nanopoudres de SiC à générer des radicaux libres HO• (Figure 107a) et COO•<sup>-</sup> (Figure 107b) en milieu acellulaire.



**Figure 107 : Signaux RPE obtenus en présence des nanoparticules de SiC respectivement (a) de l'adduit [DMPO-OH]• et (b) de l'adduit [DMPO-COO]•<sup>-</sup>. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de radicaux libres générés respectivement HO• et COO•<sup>-</sup>**

A l'inverse des particules industrielles de SiC, les nanoparticules ne présentent pas une tendance générale pour la génération de radicaux libres (HO•, COO•<sup>-</sup>).

➤ *Nanoparticules laser : SiC LP*

Pour les radicaux hydroxyles ( $\text{HO}\cdot$ ), on observe une absence de signal pour les nanoparticules de SiC LP1 (échantillon standard) ainsi que pour les échantillons enrichis en carbone (SiC LP2) et en silicium (SiC LP3). Seules les nanoparticules LP4 et LP5 présentent des signaux très significatifs comparables à ceux des poudres industrielles (ChapIV, 2.3, Figure 14).

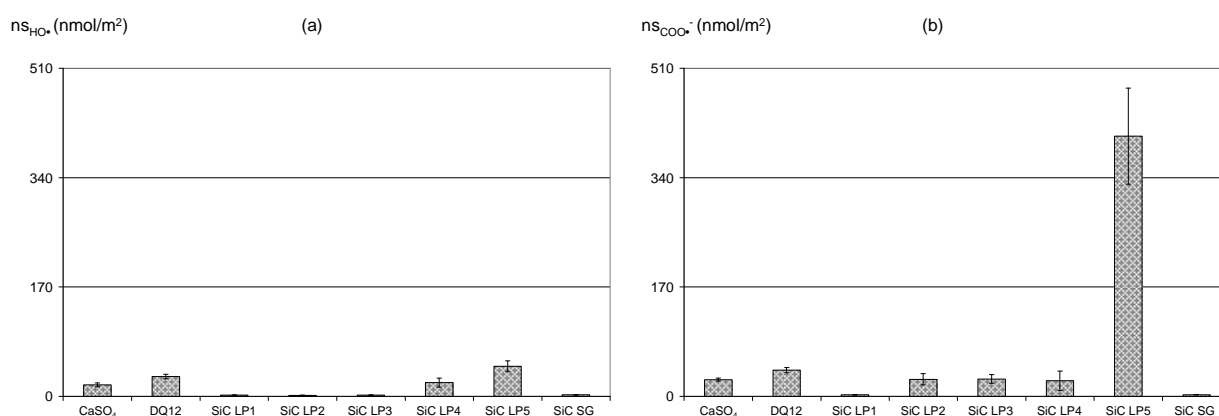
Le test avec les radicaux carboxyles ( $\text{COO}\cdot^-$ ), généralement plus sensible, permet de mettre en évidence une activité radicalaire plus prononcée. En effet, l'absence de signal pour les nanoparticules de SiC LP1, contraste avec l'activité radicalaire marquée pour l'ensemble des nanoparticules (SiC LP2, LP3, LP4, LP5).

➤ *Nanoparticules sol-gel : SiC SG*

On observe un signal nul pour l'ensemble des radicaux étudiés ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ).

Par transposition au milieu biologique, ces résultats confirment la capacité des nanoparticules LP4 et LP5 à réagir avec le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sécrété par les macrophages formant ainsi des radicaux hydroxyles extrêmement réactifs. De plus, les nanoparticules LP2, LP3, LP4, LP5 peuvent réagir avec les protéines du milieu biologique (groupements C–H) créant ainsi des dommages cellulaires et tissulaires.

D'un point de vue physico-chimique, pour pouvoir comparer les différents signaux et tenir compte des caractéristiques des nanoparticules (surface, masse de poudre utilisée pour les tests), il est indispensable de quantifier l'activité radicalaire (Figure 59).

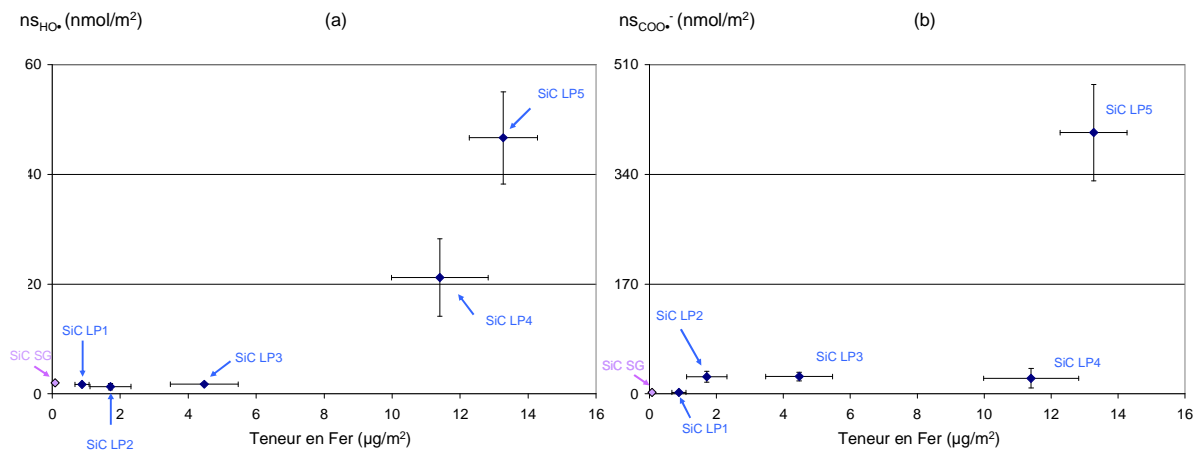


**Figure 108 : Activité radicalaire des nanoparticules de SiC en milieu acellulaire pour la génération des radicaux (a)  $\text{HO}\cdot$  et (b)  $\text{COO}\cdot^-$**

On s'aperçoit alors que des signaux RPE très intenses se situent, après quantification, à des valeurs faibles situées au niveau des témoins positif (quartz DQ12) et négatif ( $\text{CaSO}_4$ ) de toxicité dont les signaux RPE sont respectivement à peine détectables, voire dans le bruit de fond (Figure 106).

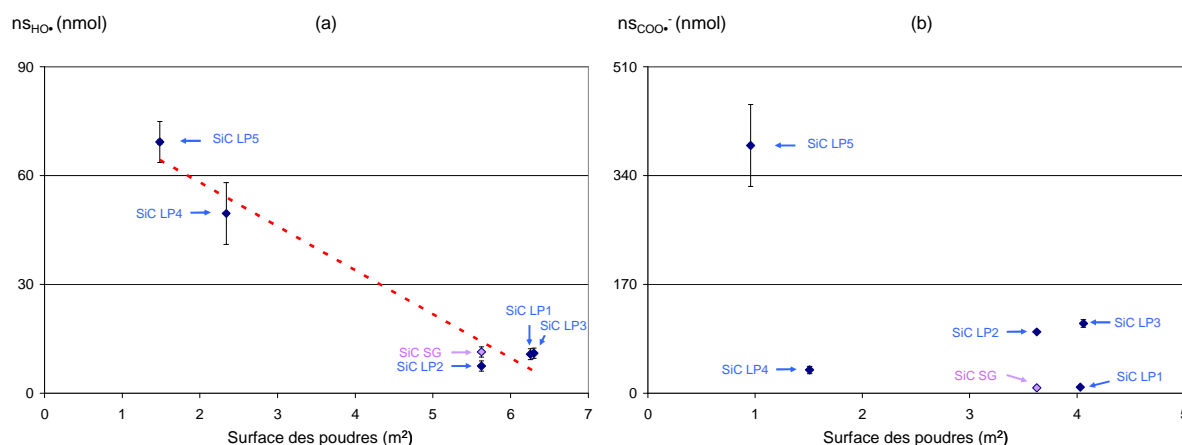
Pour les radicaux  $\text{HO}\cdot$ , les nanoparticules actives LP4 et LP5 présentent des activités radicalaires par unité de surface faibles, respectivement 20 et 50  $\text{nmol/m}^2$ . De la même façon pour le radical  $\text{COO}\cdot^-$ , les nanoparticules LP2, LP3 et LP4 présentent un faible niveau d'activité radicalaire ( $n_{\text{SCO}\cdot^-} \approx 25 \text{ nmol/m}^2$ ) qui contraste avec celui des nanoparticules LP5 ( $n_{\text{SCO}\cdot^-} \approx 400 \text{ nmol/m}^2$ ), soulignant pour ces dernières, une forte capacité à rompre des liaisons C–H.

Avec les nanoparticules, les résultats sont moins explicites quant à l'implication du fer dans les mécanismes de génération des radicaux libres (Figure 109) avec néanmoins des résultats qui vont dans le sens d'une augmentation du signal avec la proportion en fer des échantillons.



**Figure 109 : Influence des impuretés métalliques de fer contenues dans les nanoparticules de SiC sur l'activité radicalaire (a)  $\text{HO}\cdot$  et (b)  $\text{COO}\cdot^-$**

On observe également un possible effet de surface (Figure 61), avec une diminution de l'activité radicalaire en fonction de la surface (ChapIV et V).



**Figure 110 : Influence de la surface des nanoparticules de SiC sur l'activité radicalaire (a) HO• et (b) COO•-**

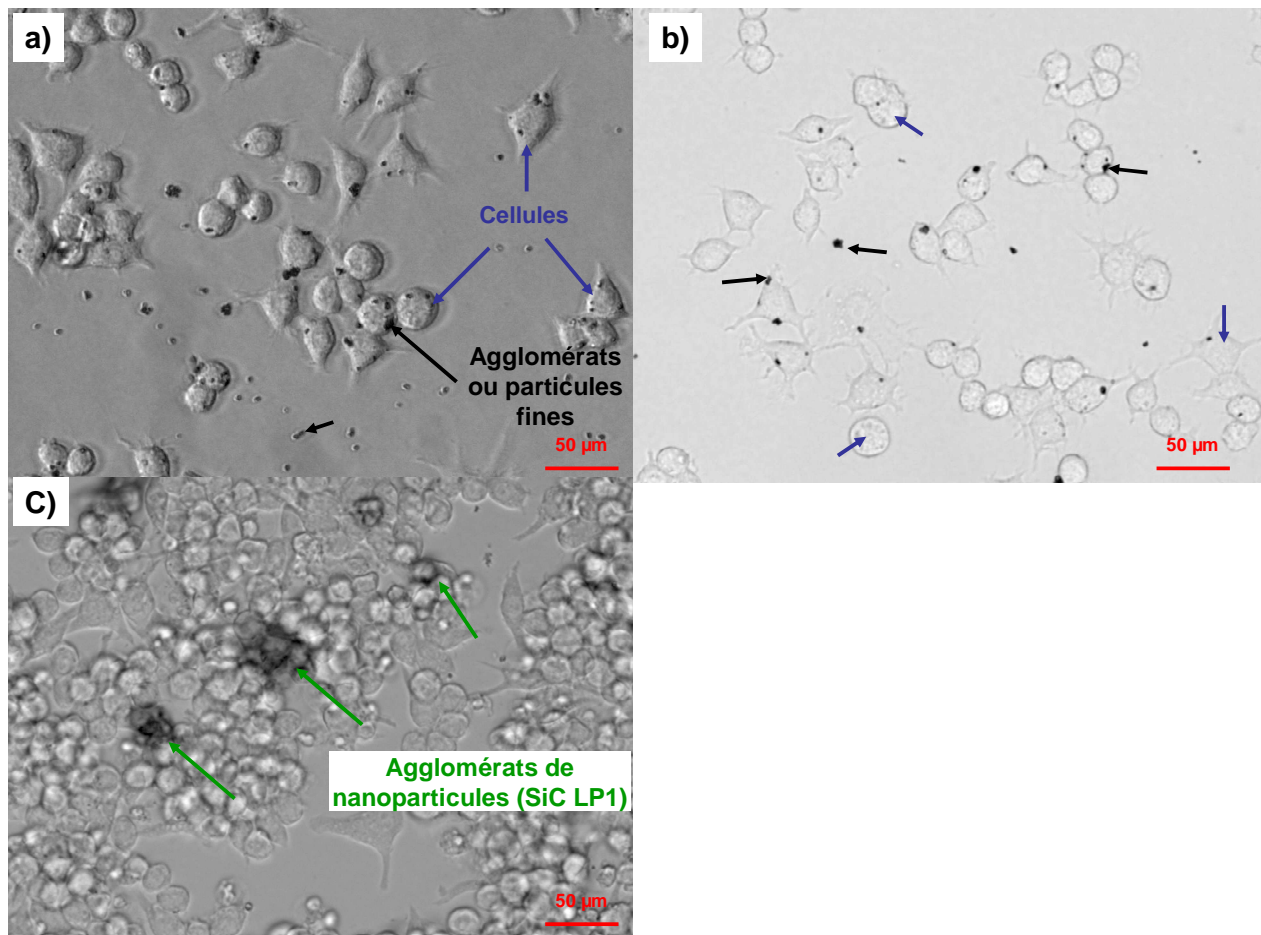
Néanmoins, il convient de rester prudent dans l'interprétation des données car la nature physico-chimique des particules étudiées est différente d'une poudre à une autre.

Les nanoparticules ne présentent pas un signal caractéristique global. Quelque soit le radical considéré (HO•, COO•<sup>-</sup>), on observe une activité nulle pour les nanopoudres élaborées par voie laser (SiC LP1) et sol-gel (SiC SG). Les nanoparticules LP2, LP3, dont l'activité est nulle pour HO•, présentent un signal RPE significatif pour les radicaux COO•<sup>-</sup> qui semble mettre en évidence le possible rôle des phases excédentaires de silicium et de carbone pour ce test. Les nanopoudres LP4 et LP5, contenant des particules plus grossières ( $S_p \approx 33$  et  $52 \text{ m}^2/\text{g}$ ) présentent dans les deux cas un signal RPE marqué.

De façon quantitative, l'activité radicalaire des nanoparticules reste très inférieure à celle des particules industrielles de SiC, proche des témoins négatif et positif de toxicité. Seule la nanopoudre LP5 génère une quantité importante de radicaux libres par unité de surface ( $n_{\text{COO}\cdot^-} \approx 400 \text{ nmol}/\text{m}^2$ ).

### 3. Activité biologique

L'activité biologique des nanoparticules de SiC est évaluée sur des macrophages en culture. Connaissant les propriétés des nanoparticules à s'agglomérer en milieu aqueux (Bouclé et al., 2005), on peut parfois observer dans le milieu biologique des agglomérats de tailles visibles en microscopie optique (Figure 89).



**Figure 111 : Images en microscopie optique (Olympus, IX2-UCB) - (a et b) Aspect du fond d'un puits de culture après 24h de contact entre les macrophages (RAW 264.7) et les nanoparticules SG. (c) Visualisation du phénomène d'agglomération de nanoparticules en milieu biologique (SiC LP1)**

Bien que certaines études utilisent des dispersants et techniques de dispersions appropriées (Brown et al., 2004a/b ; Kagan et al., 2006 ; Powers et al., 2007 ; Porter et al., 2008), nous faisons le choix dans cette étude, conformément à notre démarche théorique, d'évaluer la toxicité de particules inhalées dans un environnement de travail, censées se déposer dans la cavité alvéolaire dans des conditions proches de la réalité. De fait, on procédera suivant le même protocole opératoire que pour les particules industrielles.



### 3.1. Evaluation de la réponse cellulaire (TNF- $\alpha$ , LDH et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

#### ➤ Etat d'inflammation : TNF- $\alpha$

Les résultats du dosage du TNF- $\alpha$  (Figure 90) nous permettent d'évaluer l'activité inflammatoire des macrophages après 24 heures de contact avec les nanoparticules.

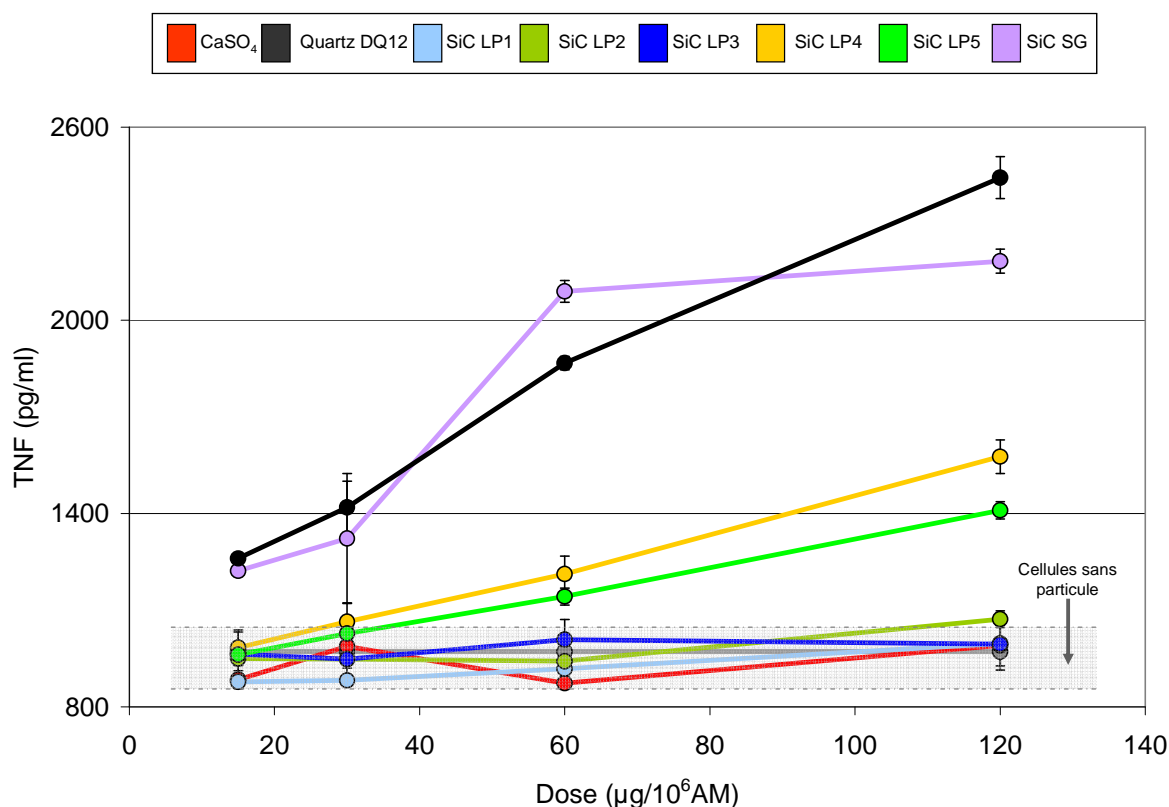


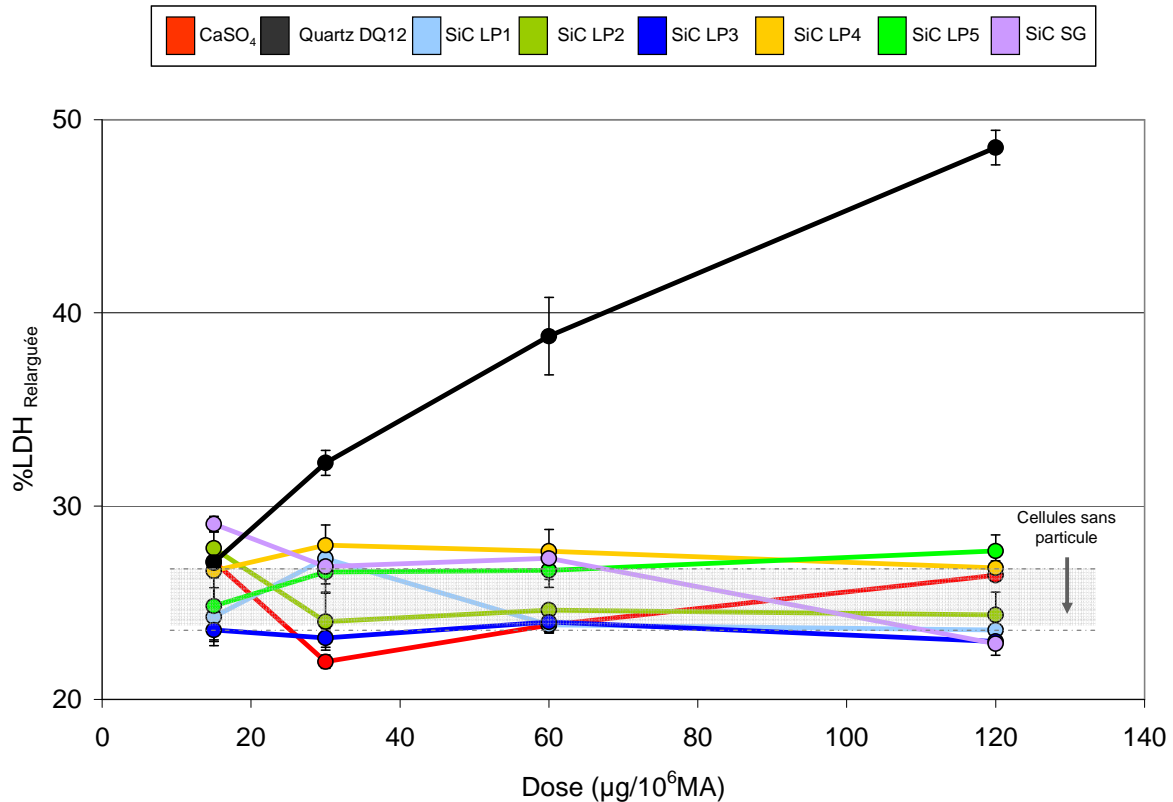
Figure 112 : Etat d'inflammation (TNF- $\alpha$ ) des macrophages alvéolaires après 24h de contact avec les nanoparticules de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP1 à LP5) et par voie sol-gel (SiC SG)

Les nanoparticules LP1, LP2 et LP3 présentent une activité inflammatoire nulle avec des valeurs voisines de celles du témoin négatif de toxicité. L'activité inflammatoire est modérée pour les nanoparticules LP4 et LP5 avec des valeurs comprises entre celles des témoins négatif et positif de toxicité, voisines de celles observées avec les particules industrielles.

La poudre de SiC SG obtenue par voie sol-gel présente une activité très significative comparable à celle du témoin positif de toxicité (Quartz DQ12) et qui suggère que ces nanoparticules sont très actives sur le paramètre de l'inflammation.

➤ *Endommagement et mort cellulaire : LDH*

Les résultats de l'endommagement et mort cellulaire provoqués par les nanoparticules de SiC (Figure 91) permettent de conclure à une absence de cytotoxicité.



**Figure 113 : Endommagement et mort cellulaire (LDH) des macrophages alvéolaires après 24h de contact avec les nanoparticules de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP1 à LP5) et par voie sol-gel (SiC SG)**

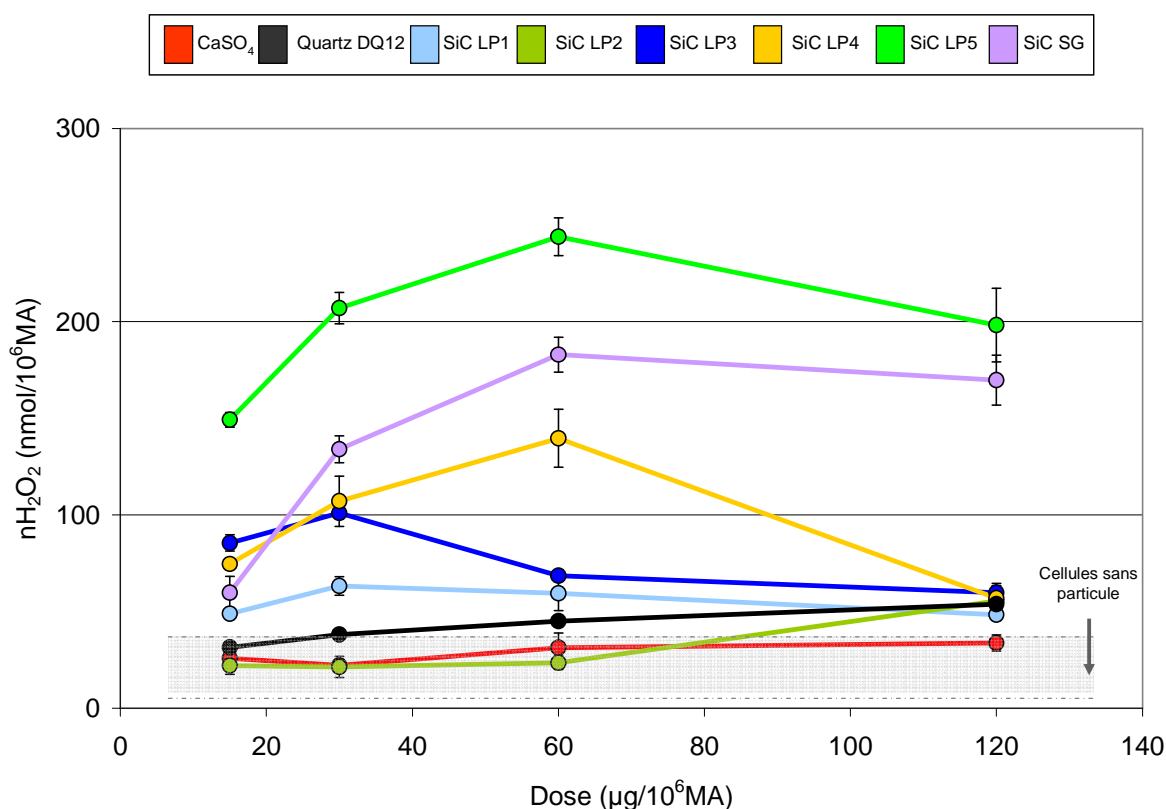
Comme nous pouvons le constater, l'ensemble des valeurs se situe au niveau du témoin négatif de toxicité et des cellules sans particule ( $\%LDH_{Relarguée} \leq 30\%$ ), bien en dessous du témoin positif de toxicité ( $\%LDH_{Relarguée} \approx 50\%$ ). Ces résultats confirment que l'ensemble des nanoparticules, comme les particules industrielles de SiC, ne sont pas cytotoxiques pour les macrophages.

Par ailleurs, l'expression des résultats en fonction de la surface des nanoparticules (cf. Annexe I) ne met pas en évidence l'implication de ce paramètre dans la réponse cellulaire pour l'état inflammatoire et la mort cellulaire (TNF- $\alpha$ , LDH).

➤ *Stress oxydant : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

La quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite par les cellules en milieu extracellulaire est proportionnelle au stress oxydant provoqué par les nanoparticules de SiC sur les macrophages.

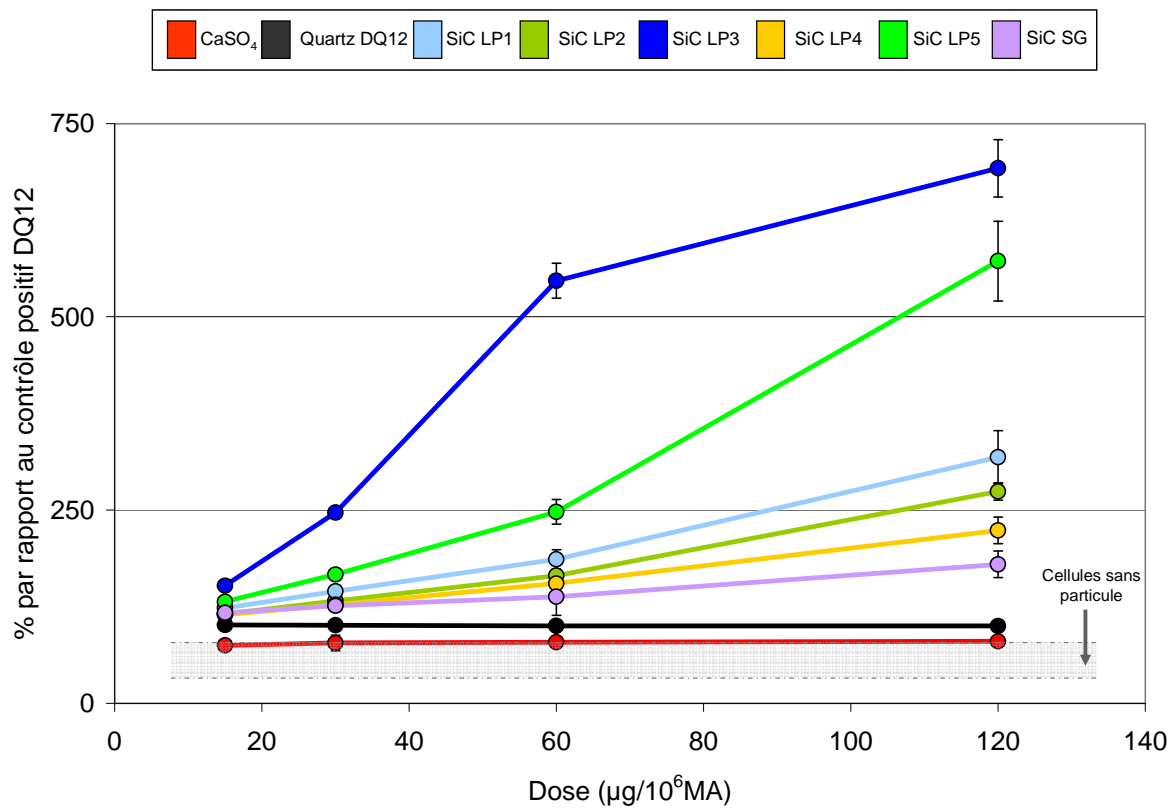
- *Stress oxydant aigu (ROS)* : A court terme (90 minutes), les cellules présentent des signaux différents suivant les nanoparticules considérées (Figure 92).



**Figure 114 : Stress oxydant aigu (ROS) des macrophages alvéolaires après 90 minutes de contact avec les nanoparticules de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP1 à LP5) et par voie sol-gel (SiC SG)**

Le stress oxydant à court terme semble modéré pour les nanoparticules LP1, LP2 et LP3 ( $50 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA} \leq n\text{H}_2\text{O}_2 \leq 70 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ ) alors qu'il semble plus marqué pour LP4 ( $n\text{H}_2\text{O}_2 \leq 140 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ ). Le signal devient très significatif pour les nanoparticules LP5 et SG atteignant des valeurs élevées ( $n\text{H}_2\text{O}_2 \approx 200 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ ). On peut également remarquer, à l'inverse de nos précédents résultats, une « cassure » à partir de  $60 \mu\text{g}/10^6 \text{ MA}$  qui suggère un possible effet de seuil au-delà duquel le phénomène d'agglomération peut devenir prépondérant. Néanmoins, ce dernier semble négligeable à long terme (Figure 93).

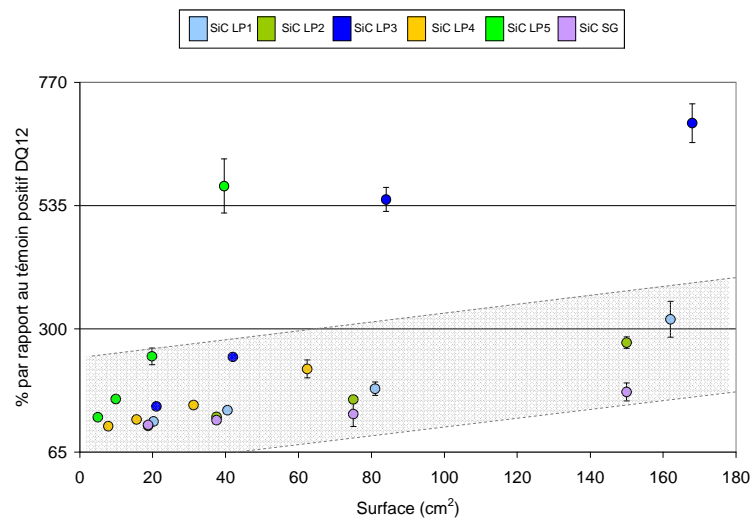
- *Stress oxydant chronique (TOX)* : Après 24 heures de contact avec les nanoparticules, les cellules présentent en général un stress oxydant très significatif (Figure 93).



**Figure 115 : Stress oxydant chronique (TOX) des macrophages alvéolaires après 24h de contact avec les nanoparticules de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP1 à LP5) et par voie sol-gel (SiC SG)**

A long terme, les différences s'exacerbent avec des niveaux très marqués pour l'ensemble des nanoparticules. On note un niveau très significatif pour les nanoparticules LP1, LP2, LP4 et SG ( $\approx 250\%$ ) comparable au niveau des particules industrielles les plus actives biologiquement (SiC A2) (Chap IV, 3.3). Certaines nanopoudres (LP3, LP5) présentent même une activité supérieure pouvant atteindre de fortes valeurs ( $\approx 600\%$ ).

Par ailleurs, l'implication du paramètre de surface semble ici moins évidente avec les nanoparticules de SiC (Figure 94).



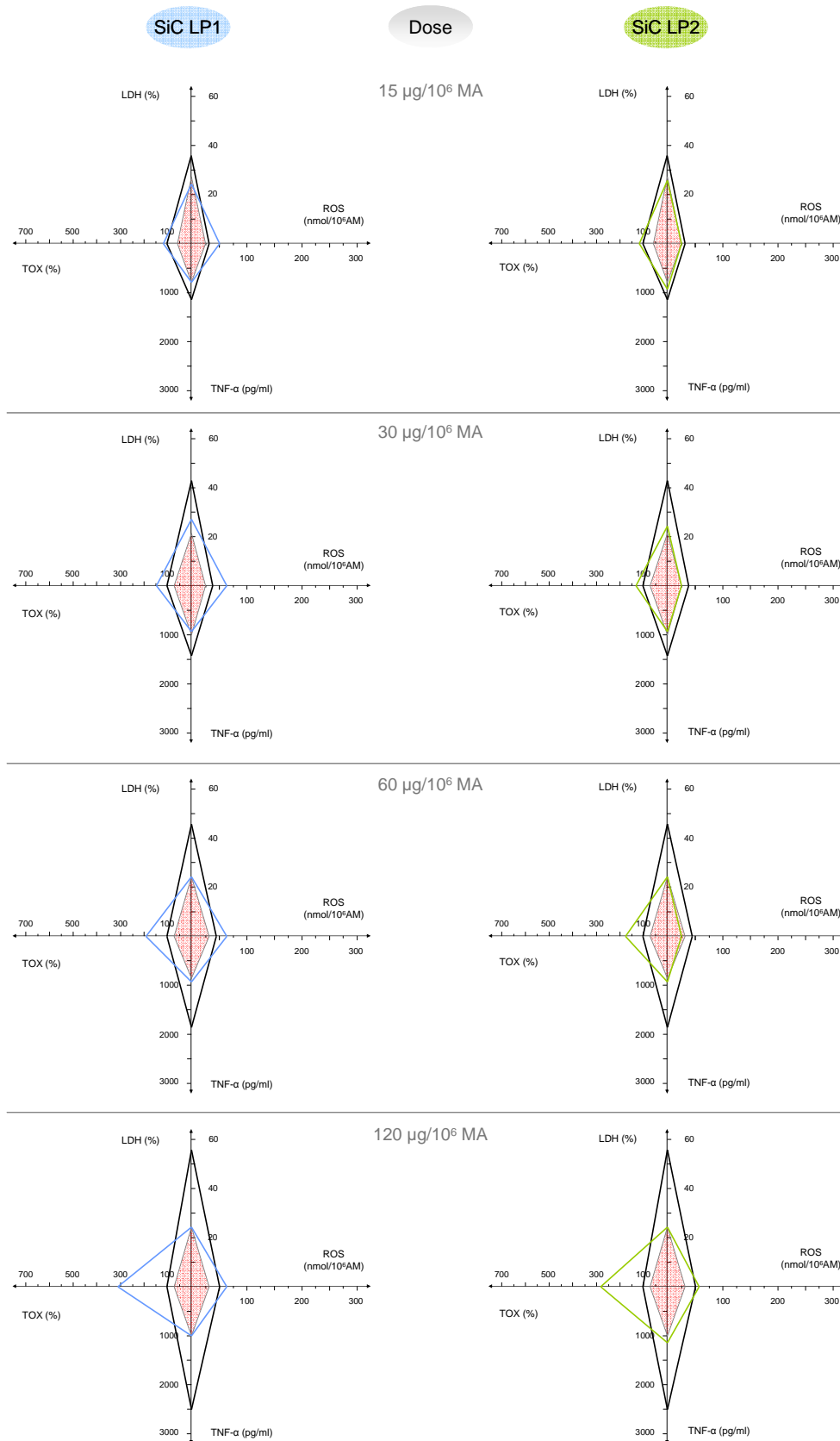
**Figure 116 : Influence de la surface des particules sur le stress oxydant chronique pour les nanoparticules de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP1 à LP5) et par voie sol-gel (SiC SG)**

Ainsi, compte tenu des surfaces mises en jeu, il se peut que d'autres mécanismes interviennent lors de l'interaction cellule/particule. Nous pouvons par exemple citer :

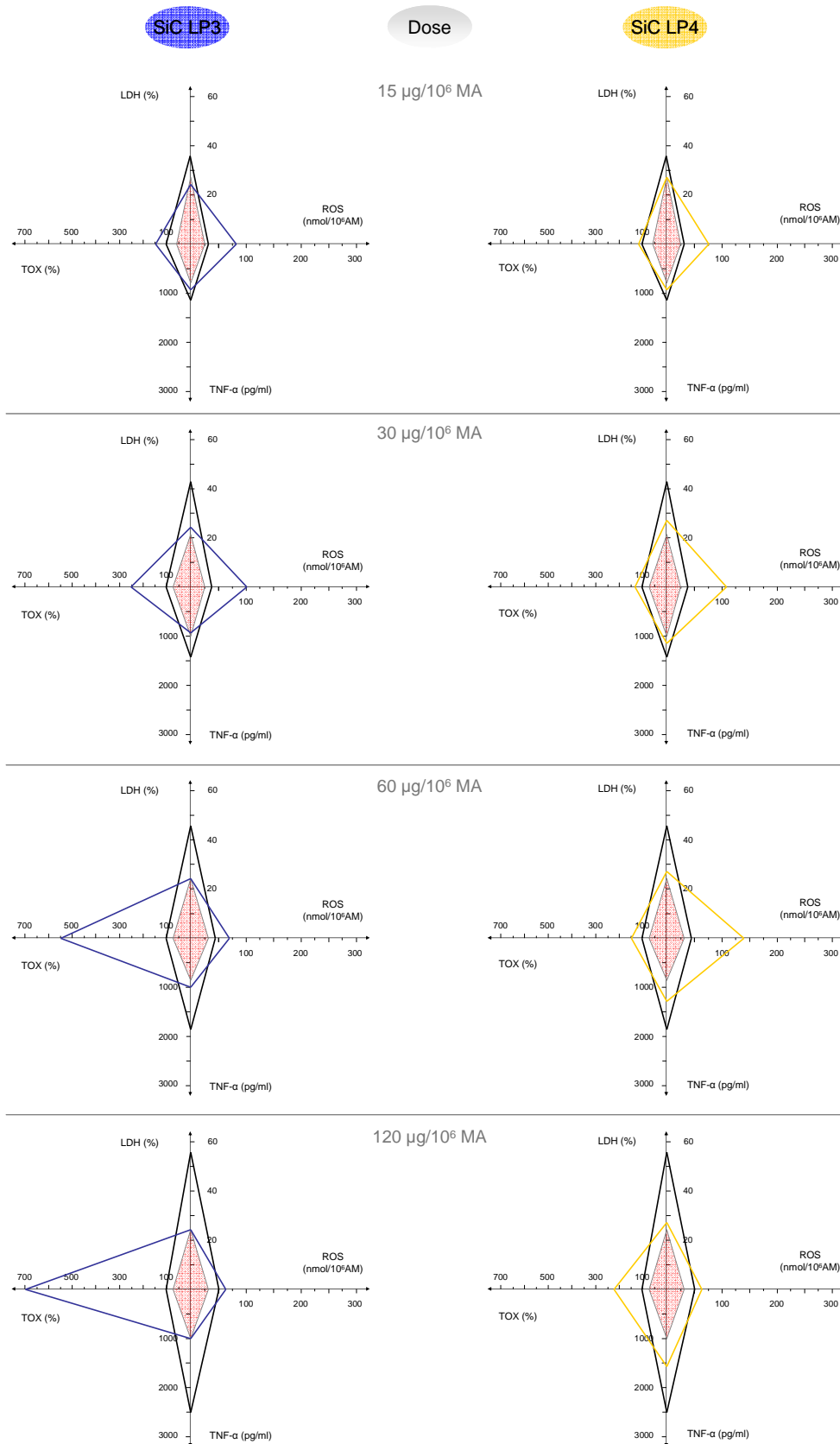
- (i) la nature de la couche en surface des grains de SiC qui semble correspondre à une phase d'oxydes mixtes ( $\text{SiO}_x\text{C}_y$ ). Celle-ci peut modifier fondamentalement la nature des interactions particule/milieu et particule/cellules ;
- (ii) la proportion d'oxygène sur les premières couches atomiques en surface des grains de SiC avec une activité très significative pour les nanoparticules LP3 et LP5 dont les proportions d'oxygène sont plus importantes ( $\%O \geq 8\%$ ).

### 3.2. Activité biologique globale

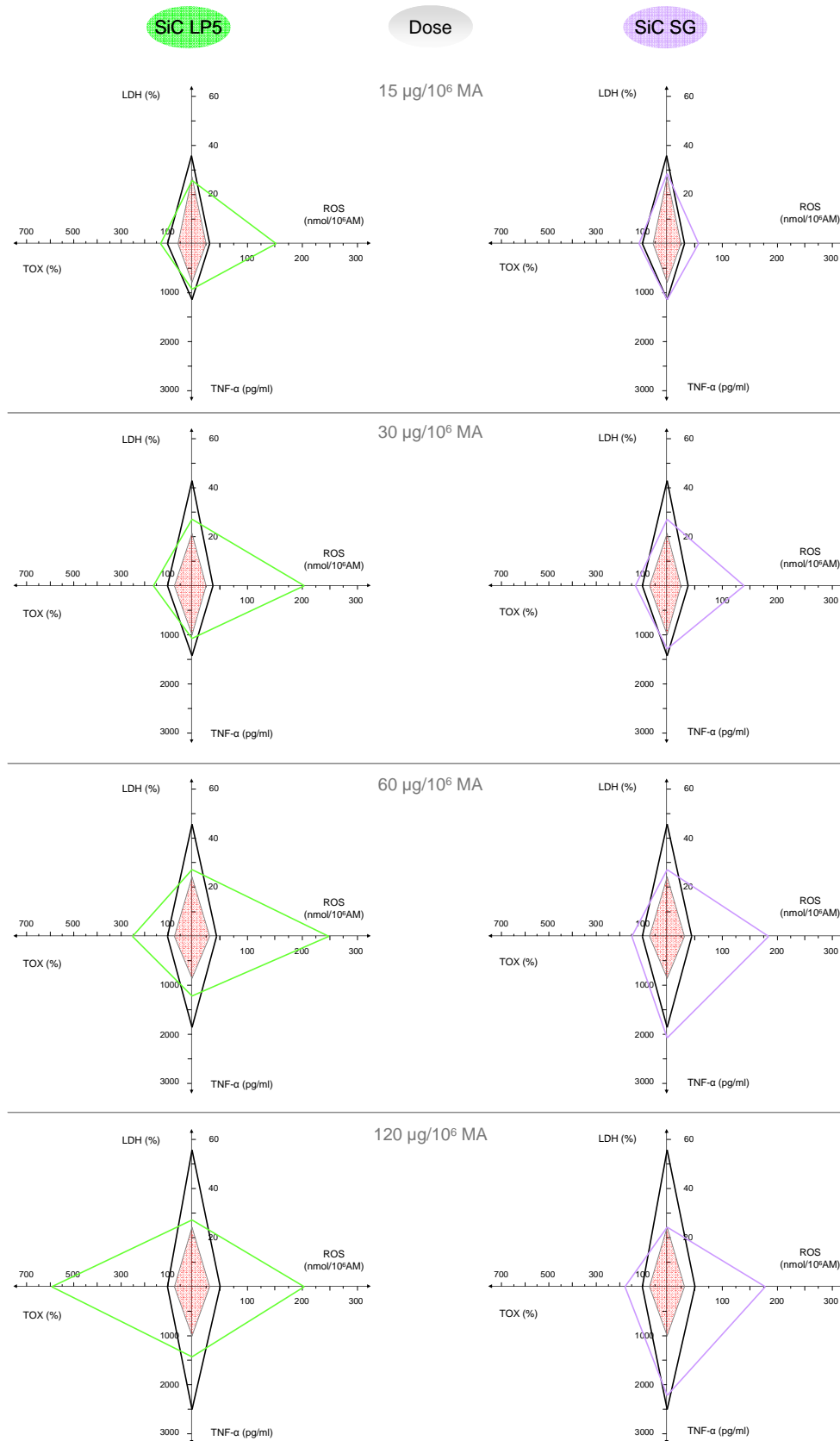
Après avoir étudié sélectivement des domaines distincts de l'activité biologique, nous pouvons exprimer nos résultats dans le modèle vecteur en reportant sur les 4 axes les paramètres des domaines de l'activité biologique étudiés en milieu cellulaire (TNF- $\alpha$ , LDH, ROS et TOX).



**Figure 117 : Evolution de l'activité biologique globale de nanoparticules de SiC LP1 et LP2 synthétisées par pyrolyse laser par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport au témoin négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**



**Figure 118 : Evolution de l'activité biologique globale de nanoparticules de SiC LP3 et LP4 synthétisées par pyrolyse laser par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport au témoin négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**



**Figure 119 : Evolution de l'activité biologique globale de nanoparticules de SiC LP5 et SG synthétisées respectivement par pyrolyse laser et par voie sol-gel par suivi de l'évolution du quadrilatère par rapport au témoin négatif (rouge) et positif (noir) de toxicité**



L'évolution de l'activité biologique globale permet de mettre en évidence des différences visuelles entre les échantillons étudiés (Figure 95, Figure 96, Figure 97). Les nanopoudres LP1, LP2 et LP4 ont une même activité biologique significative contrairement aux autres nanoparticules (LP3, LP5) dont l'activité biologique est encore plus marquée avec une forte déformation des quadrilatères sur l'axe horizontale du stress oxydant (ROS, TOX).

Les nanoparticules de SiC synthétisées par voie sol-gel présentent un signal intermédiaire caractérisé par une forte augmentation de l'état inflammatoire.

Globalement, les nanoparticules semblent présenter une activité biologique bien supérieure à celle des poudres industrielles de SiC avec une action prépondérante sur le stress oxydant.

#### 4. Synthèse

Les échantillons de SiC sont principalement caractérisés par des particules de tailles nanométriques, avec des surfaces spécifiques élevées ( $S_p \geq 100 \text{ m}^2/\text{g}$ ) et une morphologie sphérique caractéristique de ces voies de synthèse. La structure cristalline est essentiellement cubique (SiC-3C) avec des tailles de cristallites de 3 à 5 nm en accord avec les observations effectuées dans d'autres études (Herlin-Boime et al., 2002 ; Boucle et al., 2005). Seules les particules LP4 et LP5 sont plus grossières ( $S_p \leq 50 \text{ m}^2/\text{g}$ ) et contiennent quelques particules de taille importante (1 à 2  $\mu\text{m}$ ) de morphologie comparable à celle des particules industrielles fines (A2 et A5). LP1 est la seule poudre stœchiométrique ( $C/Si = 1$ ) contrairement à LP2 enrichie en carbone ( $C/Si \approx 1,21$ ) et les autres nanoparticules (LP3, LP4, LP5 et SG) qui présentent un excès de silicium ( $C/Si \leq 0,9$ ). L'état de surface révèle un faible taux d'oxygène sur les premières couches atomiques ( $\%O \leq 8\%$ ). Sur la base des clichés METHR, une fine couche de silice ( $e < 2 \text{ nm}$ ) (Herlin-Boime et al., 2002) semble recouvrir les grains mais il semble, selon nos observations, que cette couche s'apparente plus à une phase d'oxycarbure de silicium ( $\text{SiO}_x\text{C}_y$ ), principalement pour LP1, LP2 et LP4. Seules les particules de SiC LP3 et LP5 présentent la composante attribuée à la silice (liaison Si-O<sub>2</sub>) ; ces dernières contenant une quantité plus importante d'oxygène ( $\%O \geq 10\%$ ).

L'activité radicalaire des nanoparticules ne présente pas une tendance générale claire. En effet, on observe une activité nulle pour les nanopoudres standards élaborées par voie laser (SiC LP1) et sol-gel (SiC SG). Les nanoparticules LP2, LP3, dont l'activité est nulle pour HO•, présentent un signal RPE significatif pour les radicaux COO•<sup>-</sup>. Seules les nanopoudres LP4 et LP5, contenant des particules plus grossières ( $S_p \leq 50 \text{ m}^2/\text{g}$ ) présentent dans les deux cas un signal RPE marqué.

A l'exception de la nanopoudre LP5 qui génère une quantité importante de radicaux libres ( $n_{\text{SCOO}\cdot} \approx 400 \text{ nmol}/\text{m}^2$ ), la quantification de l'activité radicalaire par unité de surface des nanoparticules reste très inférieure à celle des particules industrielles de SiC, proche des témoins négatif et positif de toxicité. L'analyse des résultats semble confirmer l'implication de la surface dans les mécanismes de génération des radicaux libres HO• et COO•<sup>-</sup>.

Les résultats de l'activité biologique montrent que les nanoparticules ont une activité inflammatoire nulle (LP1, LP2 et LP3) ou modérée (LP4 et LP5). La poudre de SiC SG présente, quant à elle, une activité très significative suggérant une forte activité de ces particules sur l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ). A l'image des particules industrielles de SiC, l'ensemble des nanoparticules n'est pas cytotoxique pour les macrophages. A court terme, le stress oxydant semble modéré (LP1, LP2, LP3 et LP4) mais peut atteindre des valeurs très significatives (LP5 et SG avec  $nH_2O_2 \approx 200 \text{ nmol}/10^6 \text{ MA}$ ). Ces différences s'exacerbent à long terme (24 heures d'interaction), avec des niveaux très marqués pour l'ensemble des nanoparticules LP1, LP2, LP3, LP4 et SG ( $\approx 250\%$ ). L'activité devient très significative pour les nanoparticules LP3 et LP5 ( $\approx 600 \%$ ) suggérant un stress cellulaire conséquent.

Le niveau de l'activité biologique globale est significatif pour les nanopoudres LP1, LP2 et LP4. Ce niveau devient très marqué pour les nanoparticules LP3, LP5 et SG. L'ensemble de ces observations conduit à considérer les nanoparticules de SiC comme biologiquement actives avec une action prépondérante sur le stress oxydant.

Ces résultats semblent traduire une modification de la nature des interactions particule/cellule. La phagocytose n'est plus forcément le paramètre caractéristique de cette interaction (Brown et al., 2007), puisque de par leur faible taille, les nanoparticules peuvent pénétrer la cellule sans déclencher le mécanisme de phagocytose (Hoffman et al., 2003) ayant de fait un impact sur la réponse cellulaire (Raymond et al., 2008). Néanmoins, il demeure difficile de clairement identifier les caractéristiques structurales des poudres (taille, surface, morphologie, état de surface, cristallinité, etc.) qui interviennent directement dans la réponse cellulaire.

## 5. Conclusion

Ainsi, l'étude des nanoparticules permet d'estimer à titre préventif l'activité biologique de nanopoudres synthétisées par voie laser et par voie sol-gel (Tableau 20).

	Paramètres	SiC LP1	SiC LP2	SiC LP3	SiC LP4	SiC LP5	SiC SG
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	—	—	—	+	+	++
Mort cellulaire	LDH	—	—	—	—	—	—
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	+++	+++	++++	+++	++++	+++

Nomenclature	
—	Nul
+	Modéré
++	Significatif
+++	Très significatif
++++	Extrêmement significatif

**Tableau 20 : Résumé de l'activité biologique globale des nanoparticules de SiC**

Les résultats permettent de souligner une activité biologique très significative sur le stress oxydant des macrophages pour l'ensemble des nanoparticules. De manière plus générale, l'activité biologique globale est au minimum comparable à celle du témoin positif de toxicité connu pour sa toxicité (IARC, 1997).

Bien que ces particules ne déclenchent pas systématiquement un signal RPE, il semble qu'elles puissent être capables de participer à la génération des radicaux hydroxyles (LP4 et LP5) et carboxyles (LP2, LP3, LP4, LP5). A l'exception de LP5 sur le radical carboxyle, les activités radicalaires par unité de surface restent très faibles à des valeurs bien en dessous de celles observées avec les particules industrielles.

En termes de perspective, la caractérisation de la couche de surface (cristallinité, nature) et l'étude plus exhaustive du stress oxydant (ROS et RNS), domaine clef de la réponse cellulaire pour le SiC, peut nous permettre de confirmer et de mieux comprendre l'impact des nanoparticules de SiC sur la réponse cellulaire. Ces conclusions sont censées nous permettre d'aborder plus sereinement le développement à grande échelle des nanoparticules de SiC.

## CONCLUSION GENERALE

L'étude de l'activité biologique de particules minérales nécessite une approche pluridisciplinaire. Dans un premier temps, ce travail a été abordé d'un point de vue physico-chimie. Cela a permis de caractériser de manière approfondie l'ensemble des particules étudiées et d'en identifier les principales caractéristiques. Dans un second temps, l'attention s'est portée sur la culture cellulaire et la mise en place des tests biologiques afin de disposer d'un outil d'évaluation de l'activité biologique des particules sur des macrophages de lignée. Enfin, les deux approches ont été combinées permettant l'étude de l'évaluation de l'activité biologique au regard des caractéristiques physico-chimiques de ces particules.

L'étude de l'activité biologique de particules minérales a été appliquée au cas particulier du carbure de silicium (SiC). L'activité biologique de poudres de SiC, synthétisées par différentes méthodes (procédé Acheson, pyrolyse laser et sol-gel), a été évaluée sur des macrophages de lignée en étudiant différents domaines de la réponse cellulaire (Figure 120).

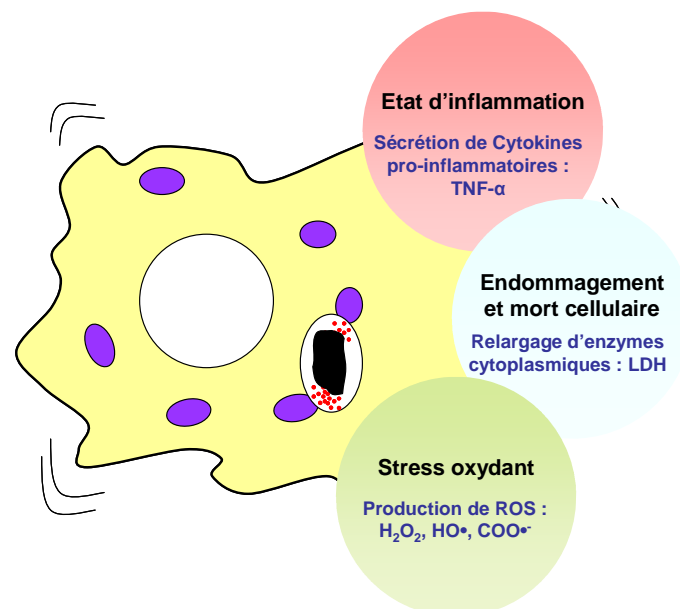


Figure 120 : Principe de l'évaluation de l'activité biologique de particules de SiC sur des macrophages

➤ *Caractéristiques physico-chimiques*

Les principales caractéristiques physico-chimiques des particules (taille, surface, morphologie, composition chimique, état de surface et activité radicalaire) ont été déterminées à l'aide de différentes techniques analytiques (Granulométrie laser, BET, observations au MEB-FEG, DRX, ICP, LECO, Fluorescence X, XPS et RPE) (Tableau 21).

	PARTICULES INDUSTRIELLES DE SiC	NANOPARTICULES DE SiC
Taille et surface	Echantillons polydisperses ( $D < 10\mu\text{m}$ ), surface spécifiques faibles ( $S_p \leq 10\text{m}^2/\text{g}$ )	Nanoparticules ( $D < 100\text{ nm}$ ) de surfaces élevées ( $30\text{m}^2/\text{g} \leq S_p \leq 140\text{m}^2/\text{g}$ )
Morphologie	Irrégulière : aspect de surface lisse, particules nanométriques et submicroniques fixées sur des particules plus larges	Sphérique
Structure cristalline	- Phase majoritaire : SiC- $\alpha$ (6H) - Impuretés : SiC-4H et SiC-15R (<10%), traces de SiO <sub>2</sub> , Si, C (<1-2%)	- Phase majoritaire : SiC- $\beta$ (3C) - Impuretés : SiC-6H (<10%), traces de Si (<1-2%)
Impuretés	- Métalliques (Fe, Al) : $1350\text{ ppm} \leq \% \text{Fe} \leq 2400\text{ ppm}$ et $300\text{ ppm} \leq \% \text{Al} \leq 750\text{ ppm}$ - Oxygène : ( $\% \text{O} \leq 1\%$ ) - Carbone libre : ( $\% \text{C} \leq 1,3\%$ )	- Métalliques (Fe, Al) : $\% \text{Fe} \leq 600\text{ ppm}$ et $\% \text{Al} \leq 400\text{ ppm}$ - Oxygène : ( $\% \text{O} \leq 4,6\%$ )
Etat de surface	Grains de SiC recouverts par une couche de silice ( $\% \text{O} \approx 20\%$ ) avec des impuretés de surface (C-C, C-O, C=O, Si-Si)	Grains de SiC recouverts par une couche de d'oxydes mixtes et/ou de silice ( $\% \text{O} \approx 8\%$ ) avec des impuretés de surface (C-C, C-O, C=O)

**Tableau 21 : Principales caractéristiques des particules de SiC**

Par ailleurs, l'utilisation de traitements thermiques oxydants a permis de modifier la surface des particules de SiC en agissant directement sur la couche de silice protectrice (nature, état de cristallinité, etc.). Les résultats ont permis d'observer une augmentation de l'épaisseur de la couche de silice et de l'oxygène sur les premiers nanomètres dès les basses températures ( $T \leq 850^\circ\text{C}$ ). A haute température ( $T = 1400^\circ\text{C}$ ), cette couche de silice cristallise en cristobalite s'accompagnant de changements morphologiques importants.

➤ *Activité radicalaire*

La capacité des particules à rompre des liaisons et à générer des radicaux libres extrêmement réactifs ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ) est un paramètre fondamental de l'étude de l'activité biologique des particules. En effet, par transposition au milieu biologique, ces radicaux peuvent être à l'origine de dommages cellulaires irréversibles par réaction avec les composants cellulaires (lipides, protéines, ADN,...) (Rahman et al., 2002 ; Governa et al. 2005 ; Lin et al., 2006).

Dans notre étude, l'activité radicalaire des particules industrielles de SiC se manifeste systématiquement par des signaux RPE significatifs à l'inverse des nanoparticules de SiC dont la tendance est plus mitigée. De plus, les résultats ont montré que les activités radicalaires par unité de surface des particules industrielles sont très élevées par rapport aux valeurs très faibles enregistrées avec les nanoparticules.

Les résultats obtenus pour les poudres industrielles oxydées montrent une diminution du signal par rapport aux poudres non oxydées. Cependant, ces résultats exprimés par unité de surface ont souligné une forte activité radicalaire pour les poudres oxydées à haute température, caractérisées par une faible surface spécifique.

L'exploitation des résultats semble mettre en évidence l'implication du fer (Fubini, 2007) et de la surface dans les mécanismes de génération des radicaux libres ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{COO}\cdot^-$ ). Néanmoins, un travail de fond reste nécessaire pour mieux appréhender ces mécanismes et identifier les paramètres principaux mis en jeu.

L'ensemble de ces effets contribue à l'entretien de la réponse cellulaire, à des modifications morphologiques des cellules et à des lésions des tissus.

➤ *Activité biologique*

L'activité biologique de chaque poudre a été évaluée *In Vitro* sur des macrophages alvéolaires en testant différents domaines de l'activité biologique : l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ), l'endommagement et la mort cellulaire (LDH) et le stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Tableau 22).

Les résultats ont montrés une activité biologique modérée (A1, A4) voire significative (A2 et A5) pour les particules industrielles de SiC. Celle-ci est significative pour l'ensemble des nanoparticules (LP1, LP2, LP3, LP4, LP5 et SG) avec une action prononcée sur le stress oxydant des macrophages.

On note une augmentation de la réponse cellulaire lorsque :

- les particules contiennent des impuretés de silice et/ou carbone (SiO<sub>2</sub>, C) dans la fraction alvéolaire inhalée (TNF- $\alpha$  pour SiC A3) ;
- la surface des poudres est modifiée par un traitement thermique oxydant à basse température (TNF- $\alpha$ , LDH).

Bien évidemment, tous ces facteurs sont étroitement liés et agissent en interaction. Les résultats ont montré qu'il peut y avoir une augmentation de l'intensité de la réponse cellulaire sur certains paramètres avec une diminution sur d'autres. C'est pourquoi la présentation des résultats sur la base du modèle vecteur permet de mieux rendre compte de l'évolution de l'activité biologique globale des particules.



PARTICULES INDUSTRIELLES DE SiC											
Domaine de la réponse cellulaire	Paramètres	SiC A1	SiC A2	SiC A3	SiC A4	SiC A5					
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	+	+	+++	+	+					
Mort cellulaire	LDH	—	—	—	—	—					
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	++	+++	++	++	+++					
PARTICULES MODIFIEES PAR TRAITEMENT THERMIQUE OXYDANT											
Domaine de la réponse cellulaire	Paramètres	SiC A1	SiC A1 650	SiC A1 750	SiC A1 850	SiC A1 1400	SiC A2	SiC A2 650	SiC A2 750	SiC A2 850	SiC A2 1400
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	+	+	+	+	—	+	+++	+++	+++	—
Mort cellulaire	LDH	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++
NANOPARTICULES DE SiC											
Domaine de la réponse cellulaire	Paramètres	SiC LP1	SiC LP2	SiC LP3	SiC LP4	SiC LP5	SiC SG				
Etat d'inflammation	TNF- $\alpha$	—	—	—	+	+	++				
Mort cellulaire	LDH	—	—	—	—	—	—				
Stress oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ROS, TOX)	+++	+++	++++	+++	++++	+++				

<b>Nomenclature</b>	—	Nul
	+	Modéré
	++	Significatif
	+++	Très significatif
	++++	Extrêmement significatif

Tableau 22 : Activité biologique globale des particules de SiC

## Perspectives

L'originalité de cette étude tient à la façon d'aborder le problème de l'activité biologique sous les deux aspects qui contrastent avec les études actuellement réalisées sur les particules. Ce travail est l'un des premiers à conjuguer une approche pluridisciplinaire au sein d'une même équipe pour évaluer l'activité biologique de particules minérales. De fait, il ouvre la voie à plusieurs perspectives.

Premièrement, l'étude RPE des radicaux libres, méthode d'évaluation de la capacité des poudres à générer des radicaux libres, peut s'élargir à d'autres paramètres (radicaux superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroxydation lipidique, etc.) afin de constituer une étude plus exhaustive de l'activité radicalaire à l'image des travaux réalisés sur des particules de silice et des nanoparticules de carbone (Kagan et al., 2006 ; Fenoglio et al., 2006).

Deuxièmement, il semble important d'approfondir les connaissances dans le domaine de l'interaction particule/cellule dont la phagocytose est un des principaux mécanismes (Chap II). La quantification de l'activité phagocytaire (quantification et cinétique, mécanismes de traversée de la membrane cytoplasmique, etc.) peut permettre une meilleure corrélation des résultats des tests *In Vitro*. D'autre part, il convient de poursuivre le travail de recherche sur les principaux paramètres clefs de la réponse cellulaire (génotoxicité, cytokines, RNS, ROS, facteurs de croissance, etc.) et de diversifier les types cellulaires étudiés, à savoir leur nature (épithéliale, etc.) et leur origine (animale, humaine). Ces mesures permettraient une évaluation plus fiable de l'activité biologique globale des particules minérales étudiées.

Enfin, il serait intéressant d'étudier le domaine spécifique de l'interaction particule/milieu afin de mieux interpréter le comportement des particules en milieu biologique : hydrophilie, pH, adsorption sur les particules (protéines, cytokines, surfactant), etc.

Ce type d'étude doit ainsi fournir des réponses aux attentes des industriels et des autorités publiques sur la compréhension des mécanismes d'actions de l'activité biologique de particules minérales afin de prendre des mesures liées à leur utilisation.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acheson E.G.** Production of artificial crystalline carbonaceous materials. *US492767*, 1982.
- Aggarwal B.B**, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur. Cyto. Netw.* 1996, vol 7, n°2, pp. 93-124.
- Alberts B**, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D. Biologie moléculaire de la cellule. *Medicine Sciences, Flammarion (3<sup>ème</sup> édition)*. 1995, pp. 1076.
- Aldieri E**, Ghigo D, Tomatis M, Prandi L, Fenoglio I, Costamagna C, Pescarmona G, Bosia A, Fubini B. Iron inhibits the nitric oxide synthesis elicited by asbestos in murine macrophages. *Free Radical Bio. Med.* 2001, vol 31, n°3, pp. 412-417.
- Allen M**, Butter R, Chandra L, Lettington A, Rushton N. Toxicity of particulate silicon carbide for macrophages, fibroblasts and osteoblast-like cells in vitro. *Biomed. Mater. Eng.* 1995, vol 5, n°3, pp. 151-159.
- Aust A.E**, Ball J.C, Hu A.A, Lighty J.S, Smith K.R, Straccia A.M, Veranth J.M, Young W.C. Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Res. Rep. Health Eff Inst.* 2002, vol 110, n°1-65, pp. 67-76.
- Baan R.A.** Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal. Toxicol.* 2007, vol 19, n°1, pp. 213-228.
- Babior B.M.** NADPH Oxidase: An Update. *Blood.* 1999, vol 93, n°5, pp. 1464-1476.
- Babior B.M.** Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 2000, vol 109, n°1, pp. 33-44.
- Bailey M.R**, Fry F.A, James A.C. The long-term clearance kinetics of insoluble particles from the human lung. *Ann. Occup. Hyg.* 1982, vol 26, n°1-4, pp. 273-290.
- Bakken J.A**, Jensen R, Monsen B, Raaness O, Waernes N. Thermal plasma process development in Norway. *Pure Appl. Chem.* 1998, vol 70, n°6, pp. 1223-1228.
- Barlow P.G**, Clouter-Baker A, Donaldson K, Maccallum J, Stone V. Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part. Fibre Toxicol.* 2005, vol 6, pp. 2-11.
- Bégin R**, Dufresne A, Cantin A, Massé S, Sébastien P, Perrault G. Carborundum pneumoconiosis. Fibers in the mineral activate macrophages to produce fibroblast growth factors and sustain the chronic inflammatory disease. *Chest.* 1989, vol 95, n°4, pp. 842-849.

- Beguin F**, Inagaki M, Benoit R, Erre R. An XPS analysis of the carbon films obtained by heat treatment of polymeric precursors. *Internal symposium on carbon*. 1990, vol 2, n°16, pp. 806-809.
- Benitez F.J**, Acero J.L, Real F.J. The role of hydroxyl radicals for the decomposition of p-hydroxy phenylacetic acid in aqueous solutions. *Wat. Res.* 2001, vol 35, n°5, pp. 1338-1343.
- Bermudez E**, Mangum J.B, Wong B.A, Asgharian B, Hext P.M, Warheit D.B, Everitt J.I. Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles. *Toxicol. Sci.* 2004, vol 77, pp. 347-357.
- Birks L. S**, Friedman H. Particle Size Determination from X-Ray Line Broadening. *J. Appl. Phys.* 1946, vol 17, pp. 687.
- Boch P**. Matériaux et processus céramiques. Paris, Hermès science publications. *Mécanique et ingénierie des matériaux. Série Alliages métalliques*. 2001.
- Bolis V**, Fubini B, Venturello G. Physico-chemical aspects in silicosis. *Inorg. Chim. Acta.* 1983, vol 79, pp. 302-303.
- Bolis V**, Fubini B, Venturello G, Borm P.J, Schins R.P, Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *Int. J. Cancer.* 2004, vol 110, n°1, pp. 3-14.
- Borm P.J.A**, Schins R, Janssen Y.M.W, Lenaerts L. Molecular basis for differences in susceptibility to coal workers pneumoconiosis. *Toxicol. Letters.* 1992, vol 64-65, pp. 767-772.
- Borm P.J.A**, Schins R.P, Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer, part B: Paradigms and risk assessment. *Int. J. Cancer.* 2004, vol 110, n°1, pp. 3-14.
- Bouclé J**, Herlin-Boime N, Kassiba A. Influence of silicon and carbon excesses on the aqueous dispersion of SiC nanocrystals for optical application. *J. Nanopart. Res.* 2005, vol 7, n°2-3, pp. 275-285.
- Bouclé J**. Elaboration et étude des propriétés électro-optiques de matériaux hybrides à base de nanocristaux de carbure de silicium. *Thèses de doctorat, Université du Maine- le Mans*. 2004, pp. 264.
- Brown D.M**, Donaldson K, Borm P.J, Schins R.P, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez L.A, Stone V. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am. J. Physiol-Lung C.* 2004, vol 286, n°2, pp. L344-353.
- Brown D.M**, Donaldson K, Stone V. Effects of PM<sub>10</sub> in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir. Res.* 2004, vol 5, n°1, pp. 1-12.

- Brown D.M**, Kinloch I.A, Bangert U, Windle A.H, Walter D.M, Walker G.S, Scotchford C.A, Donaldson K, Stone V. An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon*. 2007, vol 45, pp. 1743–1756.
- Brown D.M**, Wilson M.R, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultra-fine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultra-fines. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2001, vol 175, n°3, pp. 191-199.
- Bruch J**, Rehn B, Song H, Gono E, Malkusch W. Toxicological investigations on silicon carbide. 1. Inhalation studies. *Br. J. Ind. Med.* 1993, vol 50, n°9, pp. 797-806.
- Bruch J**, Rehn B, Song W, Gono E, Malkusch W. Toxicological investigations on silicon carbide. 2. In vitro cell tests and long term injection tests. *Br. J. Ind. Med.* 1993, vol 50, n°9, pp. 807-813.
- Bruch J**, Rehn B. Relevant differences in pathogenicity of nuisance dusts; model investigations on samples of silicon carbide dusts. *Exp. Toxicol. Pathol.* 1996, vol 48, n°6, pp. 477-480.
- Bruch J**, Rehn S, Rehn B, Borm P.J, Fubini B. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 2004, vol. 207, pp. 203-216.
- Bruusgaard A**. Pneumoconiosis in silicon carbide workers. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress of Industrial Medicine*. 1948, pp. 676-680.
- Buxton G.U**, Greenstock C.L, Helman W.P, Ross A.B. Critical review of rate constant for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (HO•/O•) in aqueous solution. *J. phys. Chem. Ref. Data*. 1988, vol 17, n°2, pp. 513-579.
- Bye E**, Eduard W, Gjønnnes J. Occurrence of airborne silicon carbide fibers during industrial production of silicon carbide. *Scand. J. Work Environ. Health*. 1985, vol 11, pp. 111–115.
- Cakmak G.D**, Schins R.P, Shi T, Fenoglio I, Fubini B, Borm P.J. In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 2004, vol 207, n°2, pp. 105-113.
- Candeias L.P**, Mac Farlane D.P.S; Mc Whinnie L.W, Maidwell N.L. Roeschlaub C.A, Sammes P.G, Whittlesey R. The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. 1998, pp.2333–2334.

- Carter J.D**, Ghio A.J, Samet J.M, Devlin R.B. Cytokine Production by Human Airway Epithelial Cells after Exposure to an Air Pollution Particle Is Metal-Dependent. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1997, vol 146, n°2, pp. 180-188.
- Castranova V**, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ. Health Persp.* 2000, vol 108, n°4, pp. 675–684.
- Cauchetier M**, Croix O, Luce M. Laser synthesis of silicon carbide powders from silane and hydrocarbon mixtures. *Adv. Ceram. Mater.* 1988, vol 3, n°6, 548-552.
- Chen C.Y**, Lin C.I, Chen S.H. Kinetics of synthesis of silicon carbide by carbothermal reduction of silicon dioxide. *Br. Ceramic. Transactions.* 2000, vol 99, pp. 57-62.
- Chen S.H**, Lin C.I. Effect of contact area on synthesis of silicon carbide through carbothermal reduction of silicon dioxide. *J. Mat. Sc. Letters.* 1997, vol 16, pp. 702-704.
- Chenhall B.E**, Ellis J, Crisp P.T, Payling L, Tandon R.K, Baker R.S. Application of X-ray photoelectron spectroscopy to the analysis of stainless-steel welding aerosols. *Appl. Surf. Sci.* 1985, vol 20, pp. 527-537.
- Chevion M**. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Bio. Med.* 1988, vol 5, n°1, pp. 27-37.
- Choi J**, Zhang Q, Reipa V, Wang N.S, Stratmeyer M.E, Hitchins V.M, Goering P.L. Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of photoluminescent silicon nanoparticles with silicon micron-sized particles in RAW 264.7 macrophages. *J. Appl. Toxicol.* 2008, vol 9999, n°9999 pp. 1263-1279.
- Cichy B**. Pathogenic and carcinogenic properties of silicon carbide. *Pol. J. Occup. Med.* 1989, vol 2, n°1, pp. 87-96.
- CIPR**. Commission Internationale de Protection Radiologique. Publication 66: Human respiratory Tract model for Radiological Protection. *Oxford, Pergamon.* 1994, vol 24, n°1-3, pp. 482.
- Cohen B.S**, Xiong J.Q, Asgharian B, Ayres L. Deposition of inhaled charged ultrafine particles in a simple tracheal model. *J. Aero. Sci.* 1995, vol 26, n° 7, pp. 1149-1160.
- Costello J.A**, Tressler R.E, Tsong I.S.T. Boron Redistribution in Sintered  $\alpha$ -SiC During Thermal Oxidation. *J. Am. Ceram. Soc.* 1981, vol 64, n°6, pp. 332-335.
- Costello J.A**, Tressler R.E. Oxidation kinetics of silicon carbide crystals and ceramics –1: In dry oxygen. *J. Am. Ceram. Soc.* 1986. vol 69, pp. 674-681.
- Costello J.A**, Tressler R.E. Oxidation-kinetics of hot-pressed and sintered alpha-SiC. *J. Am. Ceram. Soc.* 1981, vol 64, pp. 327.

- Crosbie W.A.** The respiratory health of carbon black workers. *Arch. Environ. Health*. 1986, vol 41, n°6, pp. 346-353.
- Dai C**, Zhang X, Zhang J, Yang Y, Cao L, Xia F. The synthesis of ultrafine SiC powder by the microwave heating technique. *J. Mat. Sci.* 1997, vol 32, n°9, pp. 2469-2472.
- Daniel L.N**, Mao Y, Wang T.C.L, Markey C.J, Markey S.P, Shi X, Saffiotti U. DNA strand breakage, thymine glycol production, and hydroxyl radical generation induced by different samples of crystalline silica in vitro. *Environ. Res.* 1995, vol 71, n°1, pp. 60-73.
- Darnon M.** Les Procédés par Plasmas Impliqués dans l'Intégration des Matériaux SiOCH Poreux pour les Interconnexions en Microélectronique. *Thèses de doctorat, Université Joseph Fourier - Grenoble I.* 2007, pp. 42-48.
- Das D**, Farjas J, Roura P. Passive-oxidation kinetics of SiC Microparticles. *J. Am. Ceram. Soc.* 2004, vol 87, n° 7, pp.1301-1305.
- De Heredia J.B**, Torregrosa J, Dominguez J.R, Peres J.A. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere*. 2001, vol 45, pp. 85-90.
- De la Harpe J**, Nathan C. F. A semi-automated micro-assay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol. Meth.* 1985, vol 78, n°2, pp. 323-336.
- Deal B.E**, Grove A.S. General Relationship for the Thermal Oxidation of Silicon. *J. Appl. Phys.* 1965, vol 36, n°12, pp.3770.
- Delpeux S**, Beguin F, Benoit R, Erre R, Manolova N, Rashkov I. Fullerene core star-like polymers-1. Preparation from fullerenes and monoazidopolyethers. *Eur. Polym. J.* 1998, vol 34, n°7, pp. 905-915.
- Deng F**, Xie H.Y, Wang L. Synthesis of submicron B<sub>4</sub>C by mechanochemical method. *Mat. Letters*. 2006, vol 60, n°13-14, pp. 1771-1773.
- Deroin P.** Article : Le danger des nanomatériaux. *Revue biofutur*. 2008, n°90, pp. 17.
- Dockery D.W**, Berkey C.S, Ware J.H, Speizer F.E, Ferris B.G. Distribution of forced vital capacity and forced expiratory volume in one second in children 6 to 11 years of age. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983, vol 128, n°3, pp. 405-412.
- Donaldson K**, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V. The pulmonary toxicology of ultra-fine particles. *J. Aerosol Med.* 2002, vol 15, n°2, pp. 213-220.
- Donaldson K**, Brown D.M, Mitchell C, Dineva M, Beswick P.H, Gilmour P, MacNee W. Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ. Health Persp.* 1997, vol 105, n°5, pp. 1285-1289.

- Donaldson K**, Stone V, Borm P.J.A, Jimenez L.A, Gilmour P.S, Schins R.P.F, Knaapen A.M, Rahman I, Faux S.P, Brown D.M, MacNee W. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radical Bio. Med.* 2003, vol 34, n°1, pp. 1369-1382.
- Dopp E**, Yadav S, Ansari F.A, Bhattacharya K, Von Recklinghausen U, Rauen U, Rödelsperger K, Shokouhi B, Geh S, Rahman Q. ROS-mediated genotoxicity of asbestos-cement in mammalian lung cells in vitro. *Part Fibre Toxicol.* 2005, pp. 2-9.
- Dufresne A**, Lesage J, Perrault G. Evaluation of occupational exposure to mixed dusts and polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon carbide plants. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1987, vol 48, n°2, pp. 160-166.
- Dufresne A**, Sébastien P, Perrault G, Massé S, Bégin R. Pulmonary clearance of fibrous and angular SiC particulates in the sheep model of pneumoconiosis. *Ann. Occup. Hyg.* 1992, vol 36, n°5, pp. 519-530.
- Dumortier P**. Corps asbestotiques et fibres d'asbeste dans les échantillons pulmonaires. Utilisation comme marqueurs d'expositions professionnelles ou environnementales. *Thèses de doctorat, Université Libre de Bruxelles.* 2003.
- Durand P**, Bégin R, Samson L, Cantin A, Massé S, Dufresne A, Perreault G, Laflamme J. Silicon carbide pneumoconiosis: a radiographic assessment. *Am. J. Ind. Med.* 1991, vol 20, n°1, pp. 37-47.
- Eggleston C.M**, Hochella M.F. The structure of hematite {001} surfaces by scanning tunneling microscopy; image interpretation, surface relaxation, and step structure. *Am. Mineralogist.* 1992, vol 77, pp. 911-922.
- Ekoue A**. Caractérisations électriques et physico-chimiques des oxydes sur Carbone de Silicium : Application à une technologie MOSFETs. *Thèses de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.* 2002.
- Elias Z**, Poirot O, Danière M.C, Terzetti F, Marande A.M, Dzwigaj S, Pezerat H, Fenoglio I, Fubini B. Study of cytotoxicity and morphological transformation of Syrian hamster embryo cells induced by silica with different surface properties. *Toxicol. In Vitro.* 2000, vol 14, pp. 409-422.
- Elias Z**, Poirot O, Fenoglio I, Ghiazza M, Danière M.C, Terzetti F, Darne C, Coulais C, Matekovits I, Fubini B. Surface Reactivity, Cytotoxic, and Morphological Transforming Effects of Diatomaceous Earth Products in Syrian Hamster Embryo Cells. *Toxicol. Sci.* 2006, vol 91, n°2, pp. 510-520.



- Evans P**, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutrition*. 2001, vol 85, n°2, pp. 67-74.
- Eveno P**, Li J, Huntz A.M, Chaumont J. Diffusional phenomena related to implantation of  $^{13}\text{C}$  ions in SiC. *J. Am. Ceram. Soc.* 1993, vol. 11, n°3, pp. 219-230.
- Fantoni R**, Borsella E, Piccirillo S, Ceccato R, Enzo S. Laser synthesis and crystallographic characterization of ultrafine SiC powders. *J. Mater. Res.* 1990, vol 5, n°1, pp. 143-150.
- Fenoglio I**, Fonsato S, Fubini B. Reaction of cysteine and glutathione (GSH) at the freshly fractured quartz surface: a possible role in silica-related diseases? *Free Radical Bio. Med.* 2003, vol 35, n° 7, pp. 752-762.
- Fenoglio I**, Prandi L, Tomatis M, Fubini B. Free radical generation in the toxicity of inhaled mineral particles: the role of iron speciation at the surface of asbestos and silica. *Redox Rep.* 2001, vol 6, n°4, pp. 235-241.
- Fenoglio I**, Tomatis M, Lison D, Muller J, Fonseca A, Nagy J.B, Fubini B. Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity? *Free Radical Bio. Med.* 2006, vol 40, n°7, pp. 1227-1233.
- Ferin J**, Oberdörster G, Penney D.P. Pulmonary retention of ultra-fine and fine particles in rats. *Am. J. Resp. Cell Mol.* 1992, vol 6, n°5, pp. 535-542.
- Ferin J**, Oberdörster G, Soderholm S.C, Gelein R. Pulmonary tissue access of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* 1991, vol 4, n°1, pp. 57-68.
- Filipuzzi L**. Oxydation des Composites SiC/SiC et de leurs Constituants : approche expérimentale, modélisation et influence sur le comportement mécanique. *Thèses de doctorat, Université de Bordeaux I.* 1991.
- Fisher C.E**, Rossi A.G, Shaw J, Beswick P.H, Donaldson K. Release of TNF $\alpha$  in response to SiC fibres: differential effects in rodent and human primary macrophages, and in macrophage-like cell lines. *Toxicology in Vitro.* 2000, vol 14, n° 1, pp. 25-31.
- Fubini B**, Bolis V, Cavenago A, Ugliengo P. Ammonia and water as probes for the surface reactivity of covalent solids: cristobalite and silicon carbide. *J. Chem. Soc.* 1992, vol 88, n°3, pp. 277-289.
- Fubini B**, Fenoglio I, Ceschino R, Ghiazza M, Martra G, Tomatis M, Borm P, Schins R, Bruch J. Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 2004, vol 207, n°2, pp. 89-104

- Fubini B**, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Bio. Med.* 2003, vol 34, n°12, pp. 1507-1516.
- Fubini B**, Mollo L, Giamello E. Free radical generation at the solid/liquid interface in iron containing minerals. *Free Rad. Res.* 1995, vol 23, pp. 593–614.
- Fubini B**, Wallace W.E. Modulation of silica pathogenicity by surface processes. In: E. Papirer, *Adsorption on silica surfaces. Marcel Dekker Ed.* New York. 1999, pp. 645-664.
- Fubini B**, Zanetti G, Altilia S, Tiozzo R, Lison D, Saffiotti U. Relationship between Surface Properties and Cellular Responses to Crystalline Silica: Studies with Heat-Treated Cristobalite. *Chem. Res. Toxicol.* 1999, vol 12, n°8, pp. 737 -745.
- Fubini B**. Les nanoparticules. Un enjeu majeur pour la santé au travail? *Edition, EDP science.* 2007, pp. 499-529.
- Fubini B**. Surface Chemistry and Quartz Hazard. *The Annals of Occupational Hygiene.* 1998, vol 42, n°8, pp. 521-530.
- Fubini B**. Surface Reactivity in the Pathogenic Response to Particulates. *Environ. Health Persp.* 1997, vol 105, n°5, pp. 1013-1020.
- Fujimura N**. Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2000, vol 6, pp. 140-144.
- Funahashi A**, Schlueter D.P, Pintar K, Siegesmund K.A, Mandel G.S, Mandel N.S. Pneumoconiosis in workers exposed to silicon carbide. *Am Rev Respir Dis.* 1984, vol 129, n°4, pp. 635–640.
- Gallard H**, De Laat J, Legube B. Influence du pH sur la vitesse d'oxydation de composés organiques par  $Fe^{II}/H_2O_2$ . Mécanismes réactionnels et modélisation. *New. J. Chem.* 1998, pp. 263-268.
- Gavett S.H**, Madison S.L, Dreher K.L, Winsett D.W, McGee J.K, Costa D.L. Metal and Sulfate Composition of Residual Oil Fly Ash Determines Airway Hyperreactivity and Lung Injury in Rats. *Environ. Res.* 1997, vol 72, n°2, pp. 162-172.
- Gazzano E**, Foresti E, Isidoro Giorgio Lesci I.G, Tomatis M, Riganti C, Fubini B, Roveri N, Ghigo D. Different cellular responses evoked by natural and stoichiometric synthetic chrysotile asbestos. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2005, vol 206, n°3, pp. 356-364.
- Geldart D**. Characterization of fluidized powders. *Gaz fluidization technology, John Wiley & Sons Ltd.* 1986.
- Geldart D**. The effect of particle size and size distribution on the behaviour of gas-fluidised beds. *Powder Technol.* 1972, vol 6, n°4, pp. 201-215.

- Geldart D.** Types of gas fluidization. *Powder Technol.* 1973, vol 7, n°5, pp. 285-292.
- George V.C,** Das A, Roy M, Dua A.K, Raj P, Zahn D.R.T. Bias enhanced deposition of highly oriented  $\beta$ -SiC thin films using low pressure hot filament chemical vapour deposition technique. *Thin Solid Films.* 2002, vol 419, n°1-2, pp. 114-117.
- Gessner A,** Waicz R, Lieske A, Paulke B.R, Mäder K, Müller R.H. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int. J. Pharma.* 2000, vol 196, n°2, pp. 245-249.
- Geys J,** Coenegrachts L, Vercammen J, Engelborghs Y, Nemmar A, Nemery B, Hoet P.H. In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles A preliminary study. *Toxicol Lett.* 2005.
- Ghio A.J,** Hall A, Bassett M.A, Cascio W.E, Devlin R.B. Exposure to concentrated ambient air particles alters hematologic indices in humans. *Inhal. Toxicol.* 2003, vol 15, n°14, pp. 1465-1478.
- Goodlick L.A,** Kane A.B. Role of reactive oxygen metabolites in crocidolite asbestos toxicity to mouse macrophages. *Cancer Res.* 1986, vol 46, pp. 5558-5566.
- Gourbilleau F.** Microstructure, interface et oxydation de SiC et de nanocomposites SiC-TiC. *Thèses de doctorat, Université de Caen.* 1993.
- Governa M,** Amati M, Fenoglio I, Valentino M, Coloccini S, Bolognini L, CarloBotta G, Emanuelli M, Pierella F, Volpe A, Astolfi P, Carmignani M, Fubini B. Variability of biological effects of silicas: Different degrees of activation of the fifth component of complement by amorphous silicas. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2005, vol 208, n°1, pp. 68-77.
- Greenberg S,** Silverstein S.C. Phagocytosis. In: *Paul, W.E. Ed. Fundamental Immunology.* Raven Press. 1993.
- Guo J.Y,** Gitzhofer F, Boulos M.I. Induction plasma synthesis of ultrafine SiC powders from silicon and CH<sub>4</sub>. *J. Mater. Sci.* 1995, vol 30, n°22, pp. 5589-5599.
- Gupta A,** Ghosh T, Jacob C. The influence of diluent gas composition and temperature on SiC nanopowder formation by CVD. *J. Mat. Sci.* 2007, vol 42, pp. 5142-5146.
- Gupta A,** Jacob C. A simple method to synthesize nano-sized 3C-SiC powder using hexamethyldisilane in a CVD reactor. *Mat. Sci. Forum.* 2006, vol 527-529, pp. 767-770.
- Gupta G.S,** Kumar P.V, Rudolph V.R, Gupta M. Heat-transfer model for the Acheson process. *Metallurgical and Materials Transactions A-Physical Metallurgy and Materials Science.* 2001, vol 32, n°6, pp. 1301-1308.
- Haber F,** Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. Roy. Soc. A.* 1934, vol 134, pp. 332-351.

- Halliwell B**, Gutteridge J.M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, vol 246, n°2, pp. 501-514.
- Hamoir J**, Nemmar A, Halloy D, Wirth D, Vincke G, Vanderplasschen A, Nemery B, Gustin P. Effect of polystyrene particles on lung microvascular permeability in isolated perfused rabbit lungs: role of size and surface properties. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2003, vol 190, pp. 278–285.
- Hatakeyama F**, Kanzaki S. Synthesis of Monodispersed  $\beta$ - Spherical SiC Powder by a Sol-Gel Process. *J. Am. Ceram. Soc.* 1990, vol 73, n° 7, pp. 2107-2110.
- Hayashi A**. The effect of impurity and temperature on the polytypisme of silicon carbide. *J. Mineral. Soc.* 1960, vol 4, pp. 363-371.
- Hayashi H**, Kajita A. Silicon Carbide in Lung Tissue of a Worker in the Abrasive Industry. *Am. J. Ind. Med.* 1988, vol 14, n°2, pp. 145-155.
- He J**, Ponton C. B. Oxidations of SiC powders for the preparation of SiC/mullite/alumina nanocomposites. *J. Mat. Sci.* 2003, n°43, pp.4031-4041.
- Hemenway D.R**, Absher M.P, Fubini B, Bolis V. What is the relationship between hemolytic potential and fibrogenicity of mineral dusts? *Arch. Environ. Health.* 1993, vol 48, n°5, pp. 343-347.
- Hemenway D.R**, Clarke R, Frank R, Jakab G.J. Factors Governing the Mass Loading of Aerosolized Carbon Black Particles with Acid Sulfates, Inhalation Exposure, and Alveolar Macrophage Phagocytic Function. *Inhal. Toxicol.* 1996, vol 8, n°7, pp. 676-694.
- Herlin-Boime N**, Vicens J, Ténégal F, Dufour C, Rizk R. Effect of temperature in the laser synthesis of SiC nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 2008.
- Herlin-Boime N**, Vicens J, Ténégal F, Dufour C, Rizk R. Effet de la température sur la microstructure de nanograins SiC synthétisés par pyrolyse laser. *Proceedings du congrès de Tours - Matériaux.* 2002, pp.1-5.
- Hervé-Bazin B**. Les nanoparticules. Un enjeu majeur pour la santé au travail ? *Edition, EDP science.* 2007, pp. 701.
- Hevel J.M**, White K.A, Marletta M.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 1991, vol 266, n°34, pp. 22789-22791.
- Hijikata Y**, Yaguchi H, Yoshikawa M, Yoshida S. Composition analysis of SiO<sub>2</sub>/SiC interfaces by electron spectroscopic measurements using slope-shaped oxide films. *Appl. Surf. Sci.* 2001, vol 184, n°1-4, pp. 161-166.

- Hinds W.** Aerosol technology: properties, behaviour, and measurement of airborne particles. Second edition. *Wiley-Interscience*. 1999, pp. 1-12.
- Hochella M.F.** Atomic structure, microtopography, composition, and reactivity of mineral surfaces. *Reviews in Mineral. and Geochem.* 1990, vol 23, pp. 87-132.
- Hochella M.F.** Surface chemistry, structure, and reactivity of hazardous mineral dust. *Health Effects of Mineral Dusts*. Ed Guthrie GD, Jr., Mossman BT. *Mineralogical Society of America*. 1993, vol 28, pp. 275-308.
- Hofmann W**, Sturm R, Winkler-Heil R, Pawlak E. Stochastic model of ultrafine particle deposition and clearance in the human respiratory tract. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2003, vol 105, n°1-4, pp. 77-80.
- Höhr D**, Steinfartz Y, Schins R.P, Knaapen A.M, Martra G, Fubini B, Borm P.J. The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO<sub>2</sub> in the rat. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 2002, vol 205, n°3, pp. 239-244.
- Holley J.A**, Janssen Y.M, Mossman B.T, Taatjes D.J. Increased manganese superoxide dismutase protein in type II epithelial cells of rat lungs after inhalation of crocidolite asbestos or cristobalite silica. *Am. J. Pathol.* 1992, vol 141, pp. 475–485.
- Hornetz B**, Michel H-J, Halbritter J. Oxidation and 6H-SiC-SiO<sub>2</sub> interfaces. *J. Vacuum Sci. & Technol. A*. 1995, vol 13, n°3, pp.767-771.
- Horwell C.J**, Fenoglio I, Fubini B. Iron-induced hydroxyl radical generation from basaltic volcanic ash. *Earth and Planetary Science Letters*. 2007, vol 261, n°3-4, pp. 662-669.
- Huang S.L**, Hsu M.K, Chan C.C. Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells. *Environ. Health Persp.* 2003, vol 111, n°4, pp. 478-482.
- Huang Y.C**, Ghio A.J, Stonehuerner J, McGee J, Carter J.D, Grambow S.C, Devlin R.B. The role of soluble components in ambient fine particles-induced changes in human lungs and blood. *Inhal. Toxicol.* 2003, vol 15, n°4, pp. 327-342.
- IARC 1996.** *Carbon Black*. IARC Summary & Evaluation. 1996, vol 65.
- Infante-Rivard C**, Dufresne A, Armstrong B. Cohort study of silicon carbide production workers. *Am. J. Epidemiol.* 1994, vol 140, pp. 1009–1015.
- International Agency for Research on Cancer (IARC).** Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. *International Agency for Research on Cancer*. 1997, pp. 506.
- Jeffery P.K.** Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am. J. Resp. Crit. Care*. 2001, vol 164, pp. S28-S38.

- Jensen H**, Soloviev A, Li Z, Søgaaard E.G. XPS and FTIR investigation of the surface properties of different prepared titania nano-powders. *Appl. Surf. Sci.* 2005, vol 246, n° 1-3, pp. 239-249.
- Jimenez L.A**, Drost E.M, Gilmour P.S, Rahman I, Antonicelli F, Ritchie H. PM10-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF-alpha. *Am. J. Physiol-Lung C.* 2002, vol 282, n°2, pp. 237-248.
- Johnson J.A**, Hrenya C.M, Weimer A.W. Intrinsic Reaction and Self-Diffusion Kinetics for Silicon Carbide Synthesis by Rapid Carbothermal Reduction. *J. Am. Ceram. Soc.* 2002, vol 85, n° 9, pp. 2273-2280.
- Johnson N.F**, Hoover M.D, Thomassen D.G, Cheng Y.S, Dalley A, Brooks A.L. In vitro Activity of silicon carbide whiskers in comparison to other industrial fibers using four cell culture systems. *Am. J. Indus. Med.* 1992, vol 21, n°6, pp. 807-823.
- Johnston C.J**, Driscoll K.E, Finkelstein J.N, Baggs R, O'Reilly M.A, Carter J.M, Gelein R, Oberdörster G. Pulmonary Chemokine and Mutagenic Responses in Rats after Subchronic Inhalation of Amorphous and Crystalline Silica. *Toxicol. Sci.* 2000, vol 56, pp. 405-413.
- Kagan V.E**, Tyurina Y.Y, Tyurin V.A, Konduru N.V, Potapovich A.I, Osipov A.N, Kisin E.R, Schwegler-Berry D, Mercer R, Castranova V, Shvedova A.A. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicol. Letters.* 2006, vol 165, n°1, pp. 88-100.
- Kamp D.W**, Graceffa P, Pryor W.A, Weitzman S.A. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radical Bio. Med.* 1992, vol 12, pp. 293-315.
- Kavecky S**, Janekova B, Madejova J, Sajgalik P. Silicon carbide powder synthesis by chemical vapour deposition from silane/acetylene reaction system. *J. Europ. Ceram. Soc.* 2000, vol 20, n°12, pp. 1939-1946.
- Kennedy P**, North B. The production of fine silicon carbide powder by the reaction of gaseous silicon monoxide with particulate carbon. *Proceedings of the British Ceramic Society.* 1983, pp. 1-15.
- Kim K.S**, Davis R.E. Electron spectroscopy of the nickel-oxygen system. *J. Electron Spectrosc.* 1973, vol 1, pp. 251-257.
- Kiwi J**, Lopez A, Nadtochenko V. Mechanism and kinetics of the OH radical intervention during Fenton oxidation in the presence of a significant amount of radical scavenger (Cl<sup>-</sup>). *Env. Sci. Techn.* 2000, vol 34, pp. 2162-2168.

- Knaapen A.M**, Shi T, Borm P.J, Schins R.P. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell Biochem.* 2002, vol 234-235, n°1-2, pp. 317-326.
- Knippenberg W.F.** The Growth of SiC by Recrystallization and Sublimation. *Growth Phenomena in Silicon Carbide.* 1963, vol. 18, n°3, pp. 244-266.
- Kodavanti U.P**, Hauser R, Christiani D.C, Meng Z.H, McGee J, Ledbetter A, Richards J, Costa D.L. Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. *Toxicol. Sci.* 1998, vol 43, n°2, pp. 204-212.
- Kovac C.A**, Clabes J.G, Goldberg M.J. Metal-polymer chemistry. II. Chromium-polyimide interface reactions and related organometallic chemistry. *J. Vac. Sci. Technol. A.* 1988, vol 6, n°3, pp. 991-996.
- Kreyling W.G**, Cox C, Ferron G.A, Oberdörster G. Lung clearance in Long-Evans rats after inhalation of porous, monodisperse cobalt oxide particles. *Exp. Lung. Res.* 1993, vol 19, n°4, pp. 445-467.
- Krishnan A**, Liu Y.H, Cha P, Allara D, Vogler E.A. Interfacial energetics of globular–blood protein adsorption to a hydrophobic interface from aqueous-buffer solution. *J. R. Soc. Interface.* 2006, vol 22, n° 3-7, pp. 283–301.
- Krishnarao R.V**, Godkhindi M.M, Chakraborty M, Mukunda P.G. Formation of SiC whiskers from compacts of raw rice husks. *J. Mat. Sci.* 1994, vol 29, n°10, pp. 2741-2744.
- Kumagai Y**, Arimoto T, Shinyashiki M, Shimojo N, Nakai Y, Yoshikawa T, Sagai M. Generation of Reactive Oxygen Species during Interaction of Diesel Exhaust Particle Components with NADPH-Cytochrome p450 Reductase and Involvement of the Bioactivation in the DNA Damage. *Free Radical Bio. Med.* 1997, vol 22, n° 3, pp. 479-487.
- Küpper H.U**, Breitstadt R, Ulmer W.T. Effects on the lung function of exposure to carbon black dusts. Results of a study carried out on 677 members of staff of the DEGUSSA factory in Kalscheuren/Germany. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1996, vol 68, n°6, pp. 478-483.
- Lacroix G.** Les nanoparticules. Un enjeu majeur pour la santé au travail ? *Edition, EDP science.* 2007, pp. 561-572.
- Lambrecht W.R. L**, Limpijumnong S, Rashkeev S.N, Segall B. Electronic Band Structure of SiC Polytypes: A Discussion of Theory and Experiment. *Phys. Stat. Solidi.* 1997, vol 202, pp. 5-33.

- Larsericdotter H**, Oscarsson S, Buijs J. Thermodynamic Analysis of Proteins Adsorbed on Silica Particles: Electrostatic Effects. *J. Colloid and Int. Sci.* 2001, vol 237, n°1, pp. 98-103.
- Le Bihan O**. Problématique globale des poussières fines- Note de synthèse- *Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable* – 2003.
- Leconte Y**, Maskrot H, Combemale L, Herlin-Boime N, Reynaud C. Application of the laser pyrolysis to the synthesis of SiC, TiC and ZrC pre-ceramics nanopowders. *J. Analytical and Applied Pyrolysis.* 2007, vol 79, n°1-2, pp. 465-470.
- Legrand A.P**. The Surface Properties of Silicas. *Wiley Ed.* New York. 1998.
- Leva M**, Shirai T, Wen C.Y. La prévision du début de fluidisation dans les lits solides granulaire. *Génie chimique.* 1946, vol 75, n°2, pp. 33-42.
- Li J**, Eveno P, Huntz A.M. Oxidation of SiC. *Werkstoffe und Korrosion.* 1990.
- Li J**, Kato K. A correlation of the elutriation rate constant for adhesion particles (group C particles). *Powder Technol.* 2001, vol 118, pp. 209-218.
- Li X.B**, Zhou Q.S, Liu Y.X. Oxidation behavior of sub-micrometer silicon carbide powder. *J. Nonferrous Metals.* 2000, vol 10, n°4, pp. 559–563.
- Li Y**, Liang Y, Zheng F, Hu Z. Carbon Dioxide Laser Synthesis of Ultrafine Silicon Carbide Powders from Diethoxydimethylsilane. *J. Am. Ceram. Soc.* 1994, vol 77, pp. 1662.
- Lin W**, Huang Y.W, Zhou X.D, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2006, vol 217, n°3, pp. 252-259.
- Lison D**, Lardot C, Huaux F, Zanetti G, Fubini B. Influence of particle surface area on the toxicity of insoluble manganese dioxide dusts. *Archives of Toxicol.* 1997, vol 71, n°12, pp. 725-729.
- Liu H.Y**, Weisskopf K.L, Hoffmann M.J. Oxidation behaviour of SiC whisker reinforced mullite (-ZrO<sub>2</sub>) composites. *J. Am. Ceram. Soc.* 1989, vol 5, n°2, pp. 123–133.
- Low R.B**, Leslie K.O, Hemenway D.R, Absher M, Adler K.B, Giancola M.S, Vacek P.M. Alveolar type II cell response in rats exposed to aerosols of alpha-cristobalite. *Am. J. Pathol.* 1990, vol 136, n°4, pp. 923–931.
- Lundborg M**, Bouhafs R, Gerde P, Ewing P, Camner P, Dahlén S.E, Jarstrand C. Aggregates of ultrafine particles modulate lipid peroxidation and bacterial killing by alveolar macrophages. *Environmental Res.* 2007, vol 104, n°2, pp. 250-257.
- Maddowell J.F**, Beal G.H. Immiscibility and Crystallization in Al<sub>2</sub> O<sub>2</sub> -SiO<sub>2</sub> Glasses. *J. Am. Ceram. Soc.* 1969, vol 52, n°17.



- Marcer G**, Bernardi G, Bartolucci G.B, Mastrangelo G, Belluco U, Camposampiero A, Saia B. Pulmonary impairment in workers exposed to silicon carbide. *Br. J. Ind. Med.* 1992, vol 49, n°7, pp. 489-493.
- Massé S**, Bégin R, Cantin A. Pathology of silicon carbide pneumoconiosis. *Mod. Pathol.* 1988, vol 1, n°2, pp. 104-108.
- Mauderly J.L**, Snipes M.B, Barr E.B, Belinsky S.A, Bond J.A, Brooks A.L, Chang I.Y, Cheng Y.S, Gillett N.A, Griffith W.C. Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats. Part I: Neoplastic and nonneoplastic lung lesions. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 1994, vol 68, n°1-75, pp. 77-97.
- Mauvernay B**, Presmanes L, Capdeville S, De Resende V.G, De Grave E, Bonningue C, Tailhades P. Elaboration and characterization of Fe<sub>1-x</sub>O thin films sputter deposited from magnetite target. *Thin Solid Films.* 2007, vol 515, n°16, pp. 6532-6536.
- McNeilly J.D**, Heal M.R, Beverland I.J, Howe A, Gibson M.D, Hibbs L.R, MacNee W, Donaldson K. Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2004, vol 196, n°1, pp. 95-107.
- Mieskowski D.M**, Mitchell T.E, Heuer A.H. Bubble Formation in Oxide Scales on SiC. *J. Am. Ceram. Soc.* 1984, vol 67, n°1, pp. C17-C18.
- Miles P.R**, Bowman L, Jones W.G, Berry D.S, Vallyathan V. Changes in alveolar lavage materials and lung microsomal xenobiotic metabolism following exposures to HCl-washed or unwashed crystalline silica. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1994, vol 129, n°2, pp. 235-242.
- Moissan F.H**. Etude du siliciure de carbone de la météorite de Diablo Canyon. *Compte-rendu des sciences de l'académie des Sciences, Paris.* 1905, vol 140, pp. 405-406.
- Möller W**, Hofer T, Ziesenis A, Karg E, Heyder J. Ultrafine Particles Cause Cytoskeletal Dysfunctions in Macrophages. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2002, vol 182, n°3, pp. 197-207.
- Monn C**, Becker S. Cytotoxicity and Induction of Proinflammatory Cytokines from Human Monocytes Exposed to Fine (PM<sub>2.5</sub>) and Coarse Particles (PM<sub>10-2.5</sub>) in Outdoor and Indoor Air. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1999, vol 155, n°3, pp. 245-252.
- Murphy S.A**, Bérubé K.A, Pooley F.D, Richards R.J. The response of lung epithelium to well characterised fine particles. *Life Sciences.* 1998, vol 62, n°9, pp. 1789-1799.
- Muzyka V**, Veimer S, Schmidt N. On the carcinogenic risk evaluation of diesel exhaust: Benzene in airborne particles and alterations of heme metabolism in lymphocytes as markers of exposure. *Sci. Total Environ.* 1998, vol 217, n°1-2, pp. 103-111.

- Nadif R**, Jedlicka A, Mintz M, Bertrand J.P, Kleeberger S, Kauffmann F. Effect of TNF and LTA polymorphisms on biological markers of response to oxidative stimuli in coal miners: a model of gene-environment interaction. *J. Med. Genet.* 2003, vol 40, pp. 96-103.
- Nathan C.F**, Brukner L.H, Silverstein S.C, Cohn Z.A. Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. *J. Exp. Med.* 1979, vol 149, n°1, pp. 84-99.
- Nathan C.F**, Root R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. *J Exp Med.* 1977, vol 146, n°6, pp. 1648-1662.
- Nathan C.F**. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1987, vol 80, n°6, pp. 1550-1560.
- Nehls P**, Seiler F, Rehn B, Greferath R, Bruch J. Formation and persistence of 8-oxoguanine in rat lung cells as an important determinant for tumor formation following particle exposure. *Environ. Health Persp.* 1997, vol 105, n°5, pp. 1291-1296.
- Nemmar A**, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol. Lett.* 2004, vol 149, n°1-3, pp. 243-253.
- NF EN 481** (X 43-276). Atmosphères des lieux de travail - Définition des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air. *Paris, AFNOR.* 1993, p.11.
- NF ISO 7708** (X 43-100). Qualité de l'air - Définitions des fractions de taille des particules pour l'échantillonnage lié aux problèmes de santé. *Paris, AFNOR.* 1996, pp.14.
- Nickel K.G**. The role of condensed silicon monoxide in the active-to-passive oxidation transition of silicon carbide. *J. Europ. Ceram. Soc.* 1992, n°9, pp. 3.
- Nikula K.J**, Snipes M.B, Barr E.B, Griffith W.C, Henderson R.F, Mauderly J.L. Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1995, vol 25, n°1, pp. 80-94.
- NF X 31-147**. Mise en solution totale par attaque acide. 1996.
- Novak S**, Kovač J, Dražić G, Ferreira J.M.F, Quaresma S. Surface characterisation and modification of submicron and nanosized silicon carbide powders. *J. Europ. Ceram. Soc.* 2007, vol 27, n°12, pp. 3545-3550.
- Oberdörster G**, Ferin J, Finkelstein G, Wade P, Corson N. Increased Pulmonary Toxicity of Ultrafine Particles? II. Lung Lavage Studies. *J. Aerosol Sci.* 1990, vol 21, n°3, pp. 384-387.

- Oberdörster G**, Ferin J, Gelein R, Soderholm S.C, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ. Health Persp.* 1992, vol 97, pp. 193-199.
- Oberdörster G**, Ferin J, Lehnert B.E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Persp.* 1994, vol 102, pp 173-179.
- Oberdörster G**, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Persp.* 2005, vol 113, n°7, pp. 823-839.
- Oberdörster G**, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2002, vol 65, n°20, pp. 1531-1543.
- Oberdörster G**, Yu C.P. The carcinogenic potential of inhaled diesel exhaust: a particle effect? *J. Aerosol. Sci.* 1990, vol 21, n°1, pp. S397-S401.
- Oberdörster G**. Pulmonary Carcinogenicity of Inhaled Particles and the Maximum Tolerated Dose. *Environ. Health Persp.* 1997, vol 105, n°5, pp. 1347-1355.
- Ogawara K.I**, Furumoto K, Takakura Y, Hashida M, Higaki K, Kimura T. Surface hydrophobicity of particles is not necessarily the most important determinant in their in vivo disposition after intravenous administration in rats. *J. Controlled Release.* 2001, vol 77, n°3, pp. 191-198.
- Oh S.M**, Cappelli M, Park D.W. Preparation of nano-sized silicon carbide powder using thermal plasma. *Korean J. Chemical Engineering.* 2002, vol 19, n°5, pp. 903-907.
- Önneby C**, Pantano C.G. Silicon oxycarbide formation on SiC surfaces and at the SiC/SiO<sub>2</sub> interface. *J. of Vacuum Sci. & Technol. A.* 1997, vol 15, n°3, pp.1597-1602.
- Osterman J.W**, Greaves I.A, Smith T.J, Hammond S.K, Robins J.M, Thériault G. Work related decrement in pulmonary function in silicon carbide production workers. *Br. J. Ind. Med.* 1989, vol 46, n°10, pp. 708-716.
- Pacher P**, Beckman J.S, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 2007, vol 87, n°1, pp. 315-324.
- Pandey D**, Krishna P. The origin of polytype structures. *Prog. Cryst. Growth Caract.* 1983, vol. 7, pp. 213-258.
- Papirer E**. Adsorption on Silica Surfaces. *Marcel Dekker Ed.* New York. 2000.
- Park J.C**, Kim D, Lee C.S, Kim D.K. A New Synthetic Route to Wüstite. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1999, vol 20, n° 9. pp. 1005-1009.

- Penttinen P**, Timonen K.L, Tiittanen P, Mirme A, Ruuskanen J, Pekkanen J. Number concentration and size of particles in urban air: effects on spirometric lung function in adult asthmatic subjects. *Environ. Health Persp.* 2001a, vol 109, n°4, pp. 319-323.
- Pesant L**. Elaboration d'un nouveau système catalytique à base de carbure de silicium ( $\beta$ -SiC) pour la combustion des suies issues des automobiles à moteur Diesel. *Thèses de doctorat, Université Louis Pasteur.* 2005, pp. 57-72.
- Peters A**, Wichmann H.E, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of PUF. *Am. J. Resp. Crit. Care.* 1997, vol 155, n°4, pp. 1376-1383.
- Peters J.M**, Smith T.J, Bernstein L. Pulmonary effects exposures in silicon carbide manufacturing. *Br. J. Ind. Med.* 1984, vol 41, pp. 109–115.
- Petran M**, Cocârlă A, Băiescu M. Association between bronchial hyper-reactivity and exposure to silicon carbide. *Occup. Med.* 2000, vol 50, n°2, pp. 103-106.
- Petry T.H**, Schmid P, Schlatter C.H. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two different silicon carbide plants. *Ann. Occup. Hyg.* 1994, vol 38, pp. 741-752.
- Pham-Huu C**, Bouchy C, Dintzer T, Ehret G, Estournes C, Ledoux M.J. High surface area SiC doped with zirconium for use as catalyst support. Preparation, characterization and catalytic application. *Appl. Catal. A-Gen.* 1999, vol 180, n°1-2, pp.385-397.
- Porter D**, Sriram K, Wolfarth M, Jefferson A, Schwegler-Berry D, Andrew M.E, Castranova V. A biocompatible medium for nanoparticle dispersion. *Nanotoxicology.* 2008, vol 2, n°3, pp. 144 – 154.
- Poser I**, Rahman Q, Lohani M, Yadav S, Becker H.H, Weiss D.G, Schiffmann D, Dopp E. Modulation of genotoxic effects in asbestos-exposed primary human mesothelial cells by radical scavengers, metal chelators and a glutathione precursor. *Muta. Res-Gen. Tox. En.* 2004, vol 559, n°1-2, pp. 19-27.
- Powers K.W**, Palazuelos M, Moudgil B.M, Roberts S.M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology.* 2007, vol 1, n°1, pp. 42 – 51.
- Prahalad A.K**, Inmon J, Ghio A.J, Gallagher J.E. Enhancement of 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage by coal and oil fly ash in relation to particulate metal content and availability. *Chem. Res. Toxicol.* 2000, vol 13, n°10, pp. 1011-1019.
- Pritchard R.J**, Ghio A.J, Lehmann J.R, Winsett D.W, Tepper J.S, Park P, Gilmour M.I, Dreher K.L, Costa D.L. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure increase with the concentrations of associated metals. *Inhal. Toxicol.* 1996, vol 8, pp. 457–477.

- Qi G**, Spear K.E, Pantano C.G. Carbon-layer formation at silicon-carbide/glass interfaces. *Mater. Sci. and Engineering A*. 1993, vol 162, n°1-2, pp. 45-52.
- Quanli J**, Haijun Z; Suping L, Xiaolin J. Effect of particle size on oxidation of silicon carbide powders. *Ceram. Int*. 2007, vol 33, n°2, pp. 309-313.
- Rafal R.C**. Device characteristics of sublimation grown 4H-SiC layers. *Thèses de doctorat n° 1150. Department of Physics and Measurement Technology Linköpings universitet, Sweden*. 2005, pp. 11-28.
- Rahman I**. Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochemical Pharmacol*. 2002, vol 64, n°5-6, pp. 935-942.
- Rahman Q**, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss D.G, Schiffmann D. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ. Health Persp*. 2002, vol 110, n°8, pp. 797-800.
- Raymond F**, Hamilton Jr, Sheetal A, Thakur A.H. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radical Bio. Med*. 2008, vol 44, pp. 1246-1258.
- Renwick L**, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup. Environ. Med*. 2004, vol 61, n°5, pp. 442-447.
- Rodriguez J.M**, Sanchez J.R, Alvaro A. Fluidization and elutriation of iron oxide particles. A study of attrition and agglomeration processes in fluidized beds. *Powder Technol*. 2000, vol 111, pp. 218-230.
- Romundstad P**, Andersen A, Haldorsen T. Cancer incidence among workers in the Norwegian silicon carbide industry. *Am. J. Epidemiol*. 2001, vol 153, pp. 978-986.
- Rousseau B**, Herold C, Estrade H, Estrade-szwarczopf H, Lagrange P. Sodium - Oxygen graphite intercalation compound: XPS, UPS and STM study. *Mol. Cryst. Liq. Cryst*. 1998, vol 310, pp. 231-236.
- Saffiotti U**, Ahmed N. Neoplastic transformation by quartz in the BALB/3T3/A31-1-1 cell line and the effects of associated minerals. *Teratog. Carcinog. Mutagen*. 1995, vol 15, n°6, pp. 339-356.
- Saldiva P.H**, Clarke R.W, Coull B.A, Stearns R.C, Lawrence J, Murthy G.G, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski J.J. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am. J. Resp. Crit. Care*. 2002, vol 165, n°12, pp. 1610-1617.
- Satapathy L.N**, Ramesh P.D, Dinesh A, Rustum R. Microwave synthesis of phase-pure, fine SiC powder. *Mat. Research Bull*. 2005, vol 40, pp. 1871-1882.

- Scansetti G**, Piolatto G, Botta G.C. Airborne fibrous and non-fibrous particles in a silicon carbide manufacturing plant. *Ann. Occup. Hyg.* 1992, vol 36, n°2, pp. 145-53.
- Schwier G**, Teusel I, Lewis M.H. Characterization of SiC powder and the influence of powder properties on sintering. *Pure Appl. Chem.* 1997, vol 69, n°6, pp. 1305-1316.
- Sébastien P**. Current possibilities of the biometrology of dust in specimens of bronchoalveolar lavage fluid. *Ann. Biol. Clin.* 1982, vol 40, n°3, pp. 279-293.
- Seog I.S**, Kim C.H. Preparation of monodispersed spherical silicon carbide by the sol-gel method. *J. Mater. Sci.* 1993, vol 28, pp. 3277.
- Shi T**, Schins R.P, Knaapen A.M, Kuhlbusch T, Pitz M, Heinrich J, Borm P.J. Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. *J. Environ. Monit.* 2003, vol 5, n°4, pp. 550-556.
- Shi X**, Mao Y, Daniel L.N, Saffiotti U, Dalal N.S, Vallyathan V. Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation. *Environ. Health Persp.* 1994, vol 102, n°10, pp. 149–154.
- Shi Z**, Lee J, Zhang D, Lee H, Gu M, Wu R. The passive-oxidized behaviour of SiC particles and their jointing characteristics. *J. Mat. Process. Tech.* 2001, n°110, pp. 127-131.
- Shigeyuki S**, Yoshizo I. Fundamental and solid reaction. Silicon carbide ceramics-1, edited by Shigeyuki Somiya and Yoshizo Inomata. 1988, pp. 1-11.
- Shimoda K**, Park J.S, Hinoki T, Kohyama A. Influence of surface structure of SiC nano-sized powder analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy on basic powder characteristics. *Appl. Surf. Sci.* 2007, vol 253, n°24, pp. 9450-9456.
- Shirley D.A**. High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the Valence Bands of Gold. *Phys. Rev.* 1972, pp. 4709-4714.
- Shvedova A.A**, Kisin E, Murray A.R, Johnson V.J, Gorelik O, Arepalli S, Hubbs A.F, Mercer R.R, Keohavong P, Sussman N, Jin J, Yin J, Stone S, Chen B.T, Deye G, Maynard A, Castranova V, Baron P.A, Kagan V.E. Inhalation versus aspiration of single walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress and mutagenesis. *Am. J. Physiol-Lung C.* 2008.
- Shvedova A.A**, Kisin E.R, Mercer R, Murray A.R, Johnson V.J, Potapovich A.I, Tyurina Y.Y, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs A.F, Antonini J, Evans D.E, Ku B.K, Ramsey D, Maynard A, Kagan V.E, Castranova V, Baron P. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol-Lung C.* 2005, vol 289, pp. L698–L708.
- Singhal S.C**, Lange F.F. Effect of Alumina Content on the Oxidation of Hot-Pressed Silicon Carbide. *J. Am. Ceram. Soc.* 1975, vol 58, n°9-10, pp. 433 – 435.

- Singhal S.C.** Oxidation of Silicon Nitride and Related Materials. *Nitrogen Ceramics*, ed. F.L. Riley, Noordhoff, Leyden. 1977, pp. 607-626.
- Smith T.J**, Hammond S.K, Laidlaw F, Fine S. Respiratory exposures associated with silicon carbide production: estimation of cumulative exposures for an epidemiological study. *Br. J. Ind. Med.* 1984, vol 41, n°1, pp. 100-108.
- Stohs S.J**, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Bio. Med.* 1995, vol 18, n°2, pp. 321-336.
- Stratta P**, Canavese C, Messuerotti A, Fenoglio I, Fubini B. Silica and renal diseases: no longer a problem in the 21st century? *J. Nephrol.* 2001, vol 14, n°4, pp. 228-247.
- Stuart B.O.** Deposition and Clearance of Inhaled Particles. *Environ. Health Persp.* 1976, vol 16, pp. 41-53.
- Stuart B.O.** Deposition and Clearance of Inhaled Particles. *Environ. Health Persp.* 1984, vol 55, pp. 369-390.
- Stuglik Z**, Zagorski Z.P. Pulse radiolysis of neutral iron(II) solutions : oxidation of ferrous iron by OH radicals. *Radiat. Phys. Chem.* 1981, vol 17, pp. 229-233.
- Suzuki A**, Ashida H, Furui N, Mameno K, Matsunami H. Thermal Oxidation of SiC and Electrical Properties of Al-SiO<sub>2</sub>-SiC MOS Structure. *Jpn. J. Appl. Phys.* 1982, vol 21, pp. 579-585.
- Svensson I**, Artursson E, Leanderson P, Berglind R, Lindgren F. Toxicity in vitro of some SiC and Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>: whiskers and powders. *Am. J. Ind. Med.* 1997, vol 31, n°3, pp. 335-343.
- Tasirin S.M**, Geldart D. Entrainment of FFC from fluidized beds-a new correlation for the elutriation rate constants  $K_{+∞}^i$ . *Powder Technol.* 1998, vol 95, pp. 240-247.
- Thevenot P**, Cho J, Wavhal D, Richard B, Timmons R.B, Tang L. Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*
- Tobío M**, Gref R, Sánchez A, Langer R, Alonso M.J. Stealth PLA-PEG Nanoparticles as Protein Carriers for Nasal Administration. *Pharm. Res.* 1998, vol 15, n°2, pp. 270-275.
- Tomatis M**, Fenoglio I, Elias Z, Poirot O, Fubini B. Effect of thermal treatments of refractory ceramic fibres on the induction of cytotoxicity and cell transformation. *Ann. Occup. Hyg.* 2002, vol 46, pp. 176-180.
- Tougaard S.** Quantitative Analysis of Surfaces by Electron Spectroscopy, *QUASES-IMFP-TPP2M program*. (<http://www.quases.com>).
- Tougne P**, Hommel H, Legrand A.P, Herlin N, Luce M, Cauchetier M. Evolution of the structure of ultrafine SiC laser-formed powders with synthesis conditions. *Diam. Relat. Mater.* 1993, vol 2, pp. 486.

- Tran C.L**, Buchanan D, Cullen R.T, Searl A, Jones A.D, Donaldson K. Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal. Toxicol.* 2000, vol 12, n°12, pp. 1113-1126.
- Uchida Y**, Fukuda T, Yanazawa H. X-ray photoelectron spectroscopic study of surface modification of low-k organic materials by plasma treatment. *Surf. Interface Anal.* 2004, vol 36, n°8, pp. 677-680.
- Vaben R**, Stover D. Oxidation of ultrafine (Si-) SiC powder. *J. Mater. Sci.* 1994, vol 29, pp. 3791–3796.
- Valentine R**, Chang M.J, Hart R.W, Finch G.L, Fisher G.L. Thermal modification of chrysotile asbestos: evidence for decreased cytotoxicity. *Environ. Health Persp.* 1983, vol 51, pp. 357–368.
- Valette S**. Influence de la préoxydation d'un acier sur l'adhérence de son revêtement en alumine déposé par voie plasma thermique. *Thèses de doctorat, Université de Limoges.* 2004.
- Vallyathan V**, Castranova V, Pack D, Leonard S, Shumaker J, Hubbs A.F, Shoemaker D.A, Ramsey D.M, Pretty J.R, McLaurin J.L. Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. Potential role of free radicals. *Am. J. Resp. Crit. Care.* 1995, vol 152, n°3, pp. 1003-1009.
- Vallyathan V**, Mega J.F, Xianglin S, Dalal N.S. Enhanced generation of free radicals from phagocytes induced by mineral dusts. *Am. J. Resp. Cell Mol.* 1992, vol 6, pp. 404–413.
- Van Maanen J.M**, Borm P.J, Knaapen A, Van Herwijnen M, Schilderman P.A, Smith K.R, Aust A.E, Tomatis M, Fubini B. In vitro effects of coal fly ashes: hydroxyl radical generation, iron release, and DNA damage and toxicity in rat lung epithelial cells. *Inhal. Toxicol.* 1999, vol 11, n°12, pp. 1123-1141.
- Vaughan G.L**, Trently S.A, Wilson R.B. Pulmonary response, in vivo, to silicon carbide whiskers. *Environ Res.* 1993, vol 63, n°2, pp. 191-201.
- Vincent J.H**. Aerosol science for Industrial Hygienists. *New York, Pergamon.* 1995, pp. 411.
- Vives Plourde M.F**. Altération des protéines spécifiques du surfactant Pulmonaire au cours de l'Hypoxie et l'Avitaminose. Rôle dans le développement de Pneumocystis carinii. *Thèses de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse III.* 2007.
- Wagner C.D**, Moulder J.F, Davis L.E, Riggs W.M, Mullenberg G.E. Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy. *Perking-Elmer Corporation, Physical Electronics Division.* 1979, Eden Prairie, MN, USA.

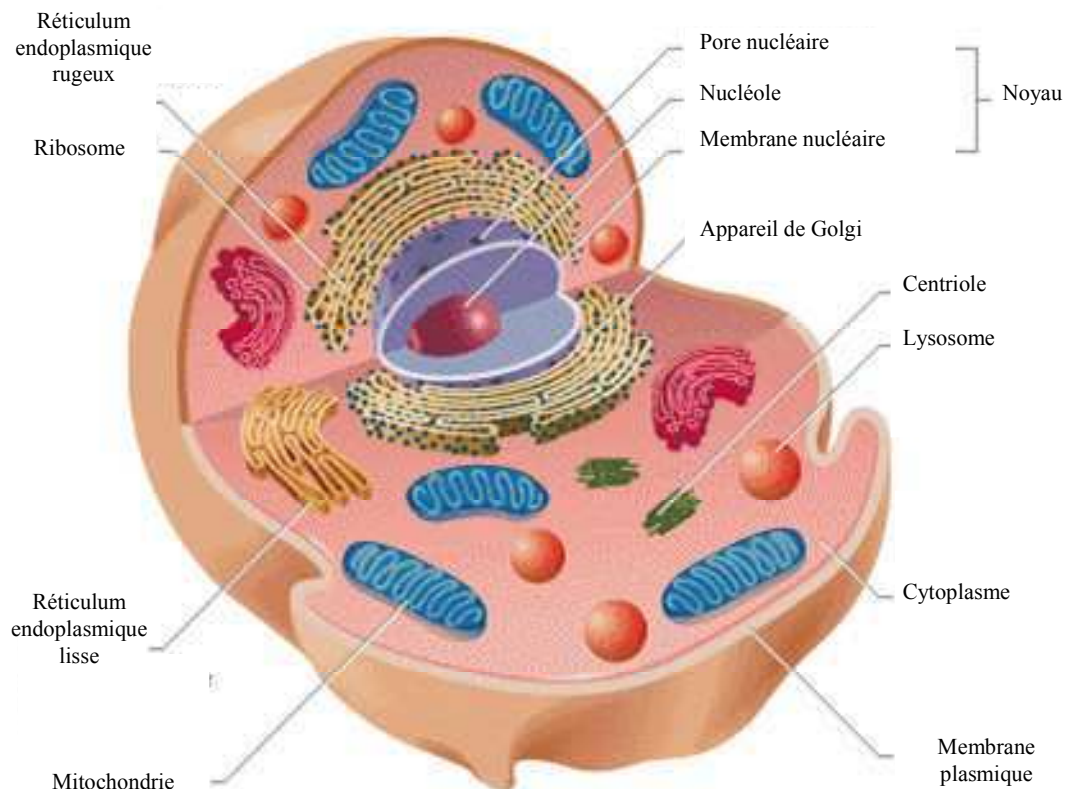


- Warheit D.B**, Webb T.R, Reed K.L. Pulmonary toxicity screening studies in male rats with TiO<sub>2</sub> particulates substantially encapsulated with pyrogenically deposited, amorphous silica. *Part. Fibre Toxicol.* 2006, vol 3, n°3, pp. 1-9.
- Warren B.E**, Averbach B.L. *J. Appl. Phys.* 1952, vol 23, pp. 1059.
- Weimer A.W**, Moore W.G, Rafaniello W, Roach R.P. Process for preparing silicon carbide by carbothermal reduction. *U. S. Pat.* 1994, n°5, pp. 340- 417.
- Wellmann J**, Weiland S.K, Neiteler G, Klein G, Straif K. Cancer mortality in German carbon black workers 1976-1998. *Occup. Environ. Med.* 2006, vol 63, n°8, pp. 513-521.
- Weng L.T**, Poleunis C, Bertrand P, Carlier V, Sclavons M, Franquinet P, Legras R. Sizing removal and functionalization of the carbon fiber surface studied by combined TOF SIMS and XPS. *J. Adhes. Sci. Technol.* 1995, vol 9, n°7, pp. 859-871.
- White D.A**, Oleff S.M, Fox J.R. Preparation of silicon carbide from organosilicon gels: II. Gel pyrolysis and SiC characterization. *Standard Oil Research and Development Center. P, patent n° ISSN0883-5551.* 1987.
- Winé G**. Synthèse de zéolithe BETA sur du β-SiC et dans des nanotubes de carbone. Application à la réaction d'acylation de Friedel-Crafts. *Thèses de doctorat, Université Louis Pasteur.* 2004, pp. 41-42.
- Winslow C.E.A**, Greenburg L, Greenberg D. The dust hazard in the abrasive industry. *Pub. Health Reports.* 1919, vol 34, pp. 1171-1187.
- Witschger O**. Les nanoparticules. Un enjeu majeur pour la santé au travail ? *Edition, EDP science.* 2007, pp. 191-215
- Yagi S**, Aochi T. Proceeding of the Spring Meeting of the Society of chemical Engineers. 1955, pp.89.
- Yajima M.D**, Kuramoto T. Sinterability of submicron β-SiC powder synthesized by carbothermal reduction of silica. *Silicon carbide ceramics-2, edited by Shigeyuki Somiya and Yoshizo Inomata.* 1988, pp. 39-49.
- Young R.A**. The Rietveld Method. *Oxford University Press.* 1993.
- Zheng Z**, Tressler R.E, Spear K.E. Oxidation of single-crystal silicon carbide. II, Kinetic model. *J. Electrochem. Soc.* 1990, vol 137, n°9, pp. 2812-2816.
- Zwirner-Baier I**, Neumann H.G. Polycyclic nitroarenes (nitro-PAHs) as biomarkers of exposure to diesel exhaust. *Mutat Res.* 1999, vol 441, n°1, pp. 135-144.

## ANNEXE A : LA CELLULE

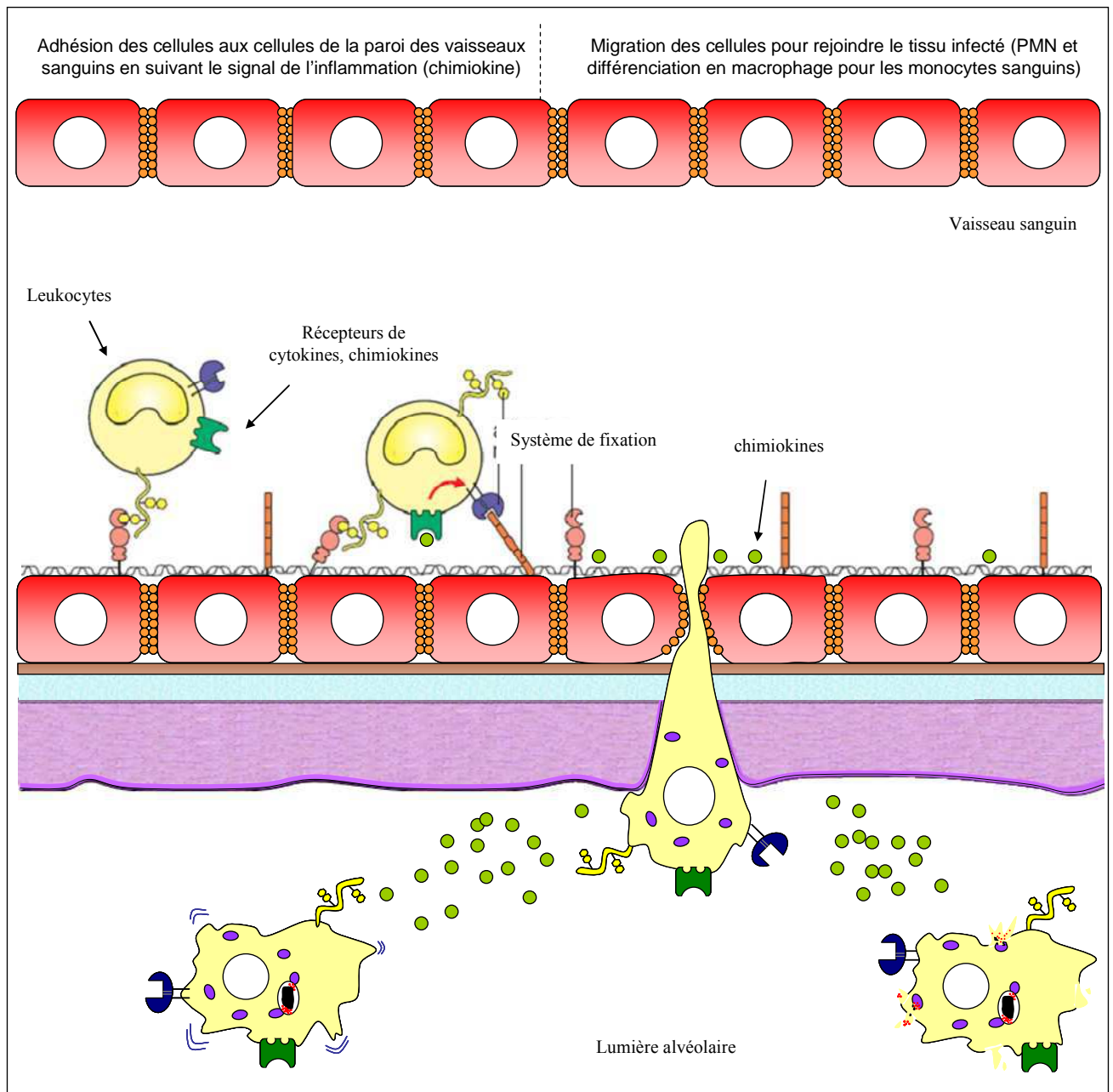
La figure suivante représente une cellule eucaryote (« noyau vrai »), c'est-à-dire que son matériel génétique est enfermé dans un noyau délimité par la membrane nucléaire. Elle est entourée, à l'extérieur, par la membrane plasmique.

L'intérieur de la cellule est occupé par un milieu aqueux appelé cytoplasme, dans lequel baignent divers organites, responsables des différentes activités cellulaires. Les mitochondries produisent, grâce à la respiration cellulaire, l'énergie nécessaire à la cellule. Le réticulum endoplasmique est impliqué dans la fabrication et la maturation des protéines. L'appareil de Golgi assure les dernières transformations des protéines, ainsi que leur tri en fonction de leur destination (protéines de la membrane, protéines sécrétées, etc.). Les lysosomes renferment un grand nombre d'enzymes variées ; ils ont pour rôle la dégradation de grosses molécules (glucides, lipides, protéines) en éléments plus simples. Les centrioles sont des éléments du squelette de la cellule (cytosquelette), un ensemble de protéines qui assurent le maintien de sa forme et ses éventuels mouvements.



## ANNEXE B : LA DIAPÉDÈSE

La diapédèse est un mécanisme de traversée des barrières endothéliales par les cellules pour rejoindre le lieu de l'inflammation. La traversée s'effectue dans les jonctions intercellulaires; elle est contrôlée par des récepteurs sur les endothéliums, et augmentée en cas d'inflammation (chimiotactisme et relâchement des jonctions). Ce mécanisme assure les passages des leucocytes entre le sang et les tissus.



## ANNEXE C : DIFFÉRENCES ENTRE PARTICULES FINES ET NANOMÉTRIQUES

(Hervé-Bazin, 2007)

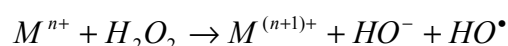
Le tableau suivant rassemble les principales différences et/ou caractéristiques des particules nanométriques (ultrafines) par rapport aux particules microniques d'un même matériau.

ASPECTS TOXICOCINETIQUES
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilités de pénétration cutanée</li> <li>- Le dépôt des PUF dans les voies respiratoires est supérieur à celui des particules de plus grande taille</li> <li>- Pénétration du tissu pulmonaire (interstitialisation)</li> <li>- Phagocytose par des cellules de l'épithélium respiratoire</li> <li>- Pénétration par les voies nerveuses (nerfs, olfactifs, rigéminé)</li> <li>- Pénétration dans différents types de cellules</li> <li>- Distribution possible dans tous l'organisme (voies lymphatique, sanguine, nerveuse, paracellulaire...)</li> <li>- Pénétration par voie digestive</li> </ul>
EFFETS LOCAUX
<p><u>Dans les cellules</u></p> <p>Perturbation du réseau microtubulaire</p> <p>Localisations mitochondriales</p> <p>Localisation dans le noyau cellulaire</p>
<p><u>Dans les tissus</u></p> <p>Dégénérescence des tissus tapissant les fosses nasales</p> <p>Vasoconstriction artérielle</p> <p>A masse égale, les PUF sont plus toxiques au niveau pulmonaire que des particules plus grosses de même composition</p> <p>Perturbations légères des fonctions respiratoires</p> <p>Renforcement ou induction de réactions allergiques</p> <p>Cancer pulmonaire</p>
EFFETS SYSTEMIQUES
<p>Possibilité de localisations cérébrales</p> <p>Perturbations du système cardiovasculaire</p> <p>Athérosclérose</p>

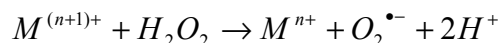
## ANNEXE D : RÉACTIONS DE FENTON ET CYCLE D'HABER-WEISS

(Fubini, 2007)

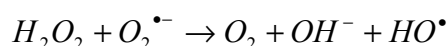
Le mécanisme le plus fréquemment impliqué dans la génération des radicaux libres HO• en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est la réaction de Fenton :



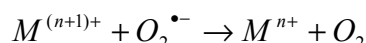
Une autre réaction possible conduit à la production d'un radical anion superoxyde par interaction de M<sup>(n+1)+</sup> avec le peroxyde d'hydrogène :



Une deuxième molécule d'eau oxygénée réagissant sur le radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produit un radical HO• :

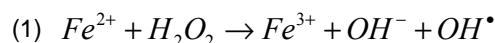


Le radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> peut à nouveau réagir avec M<sup>(n+1)+</sup> en le réduisant en M<sup>n+</sup> suivant l'équation suivante :

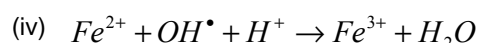
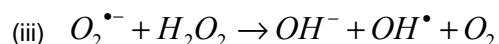
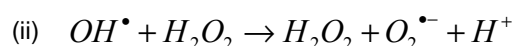
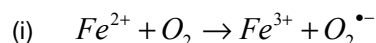


Lequel peut alors donner la réaction de Fenton. L'application au Fer permet d'obtenir les équations suivantes qui sont les plus connues dans les mécanismes de génération des radicaux libres HO•.

### Reaction de Fenton avec le Fer :



### Cycle d'Haber-Weiss :



## ANNEXE E : CULTURE CELLULAIRE

La manipulation de micro-organismes nécessite certaines mesures de sécurité, comme le travail sous hotte à flux laminaire, ou encore à proximité d'une flamme, ayant pour but d'éviter toutes sources de contamination de la culture, mais également de l'environnement de travail. Il est donc nécessaire de stériliser tout matériel et objet faisant partie de l'expérimentation.

### ➤ *Culture cellulaire*

Les cellules étudiées sont issues de la lignée RAW 264.7 (ATCC : American Type Culture Collection) provenant de macrophages alvéolaires (MA) de souris transformés par une souche virale de leucémie murine Ab-MLV (Abelson Murine Leukemia Virus). Ces cellules ont un taux de prolifération important et permettent de disposer de suffisamment de matériel cellulaire pour les différentes expériences.

Le milieu de culture était composé de 10 mL de sérum de veau foetal (SVF 10%) décomplémenté (Gibco), 1 mL de pénicilline-streptomycine (pénicilline à 10 000 unités/mL, streptomycine à 10 mg/mL ; Sigma), dans 100 mL de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Gibco).

### ➤ *Numération cellulaire*

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est-à-dire en nombre de cellules par unité de volume. La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération). La cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage. Le volume de comptage est déterminé par : (i) la surface du quadrillage gravé sur la lame, (ii) la profondeur de la chambre.

Les cellules sont comptées au microscope à l'objectif x40 (1 rectangle par champ). Pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, on compte seulement celles qui chevauchent 2

arêtes du rectangle sur 4 (en pratique on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

➤ *Calcul de la concentration cellulaire*

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

Soient :

- n : nombre de cellules comptées
- V : volume de comptage = volume d'un rectangle x nombre de rectangle comptés
- N : nombre de cellules par litres

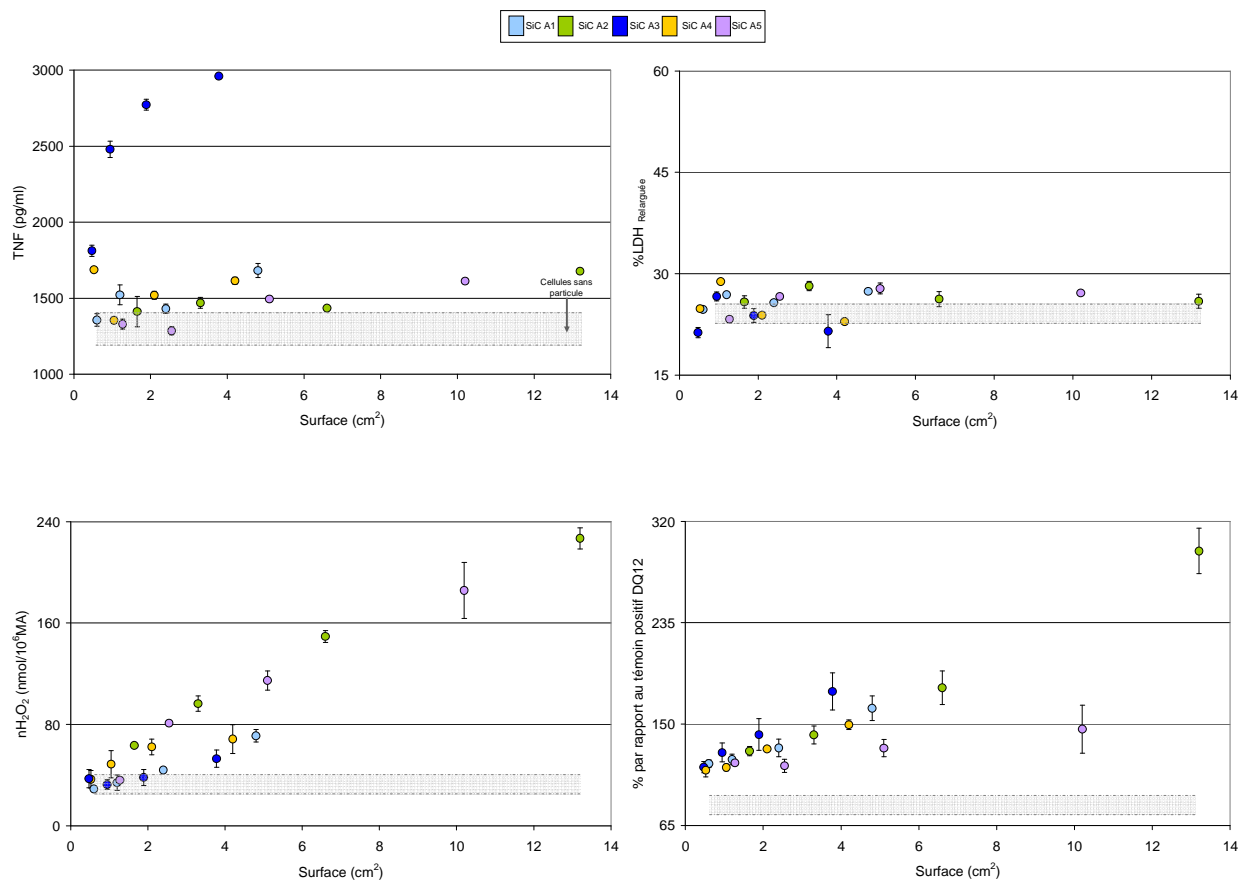
Si on a n cellules dans V litres, alors on a N cellules dans un litre :

$$N \times V = n \times 1$$

$$N = \frac{n}{V}$$

## ANNEXE F : RÉSULTATS DES TESTS IN VITRO EXPRIMÉS EN FONCTION DE LA SURFACE DES PARTICULES - PARTICULES INDUSTRIELLES DE SiC-

L'ensemble des résultats relatifs à l'évaluation de l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ) de l'endommagement et mort cellulaire (LDH) et du stress oxydant ( $H_2O_2$ ) ont été exprimés en fonction de la surface des particules (Figure 121).



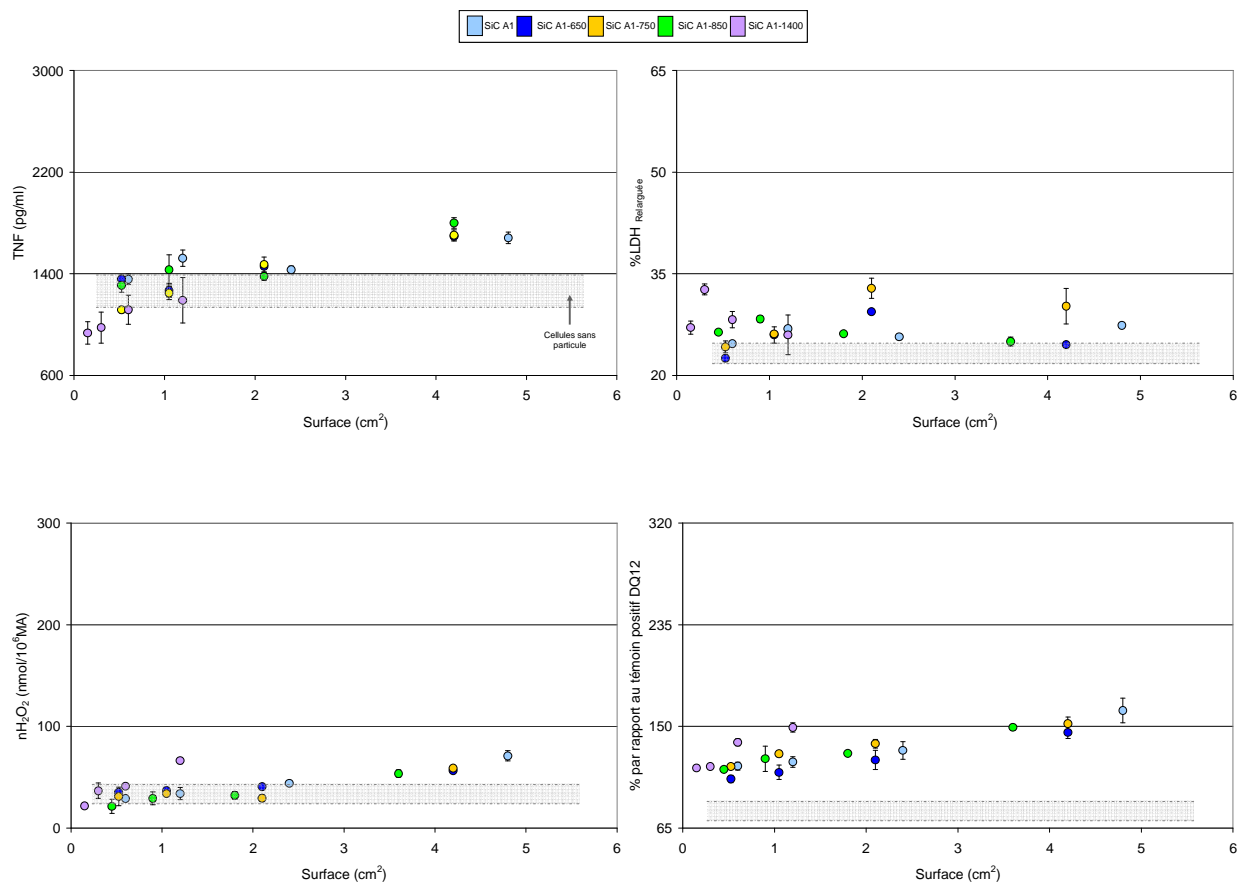
**Figure 121 : Ensemble des résultats des tests *In Vitro* sur les macrophages de lignée des particules industrielles de SiC exprimés en fonction de la surface des particules**

Ces résultats semblent confirmer une tendance sous-entendant que la surface d'exposition des particules constitue un paramètre crucial pour le stress oxydant (ROS et TOX).

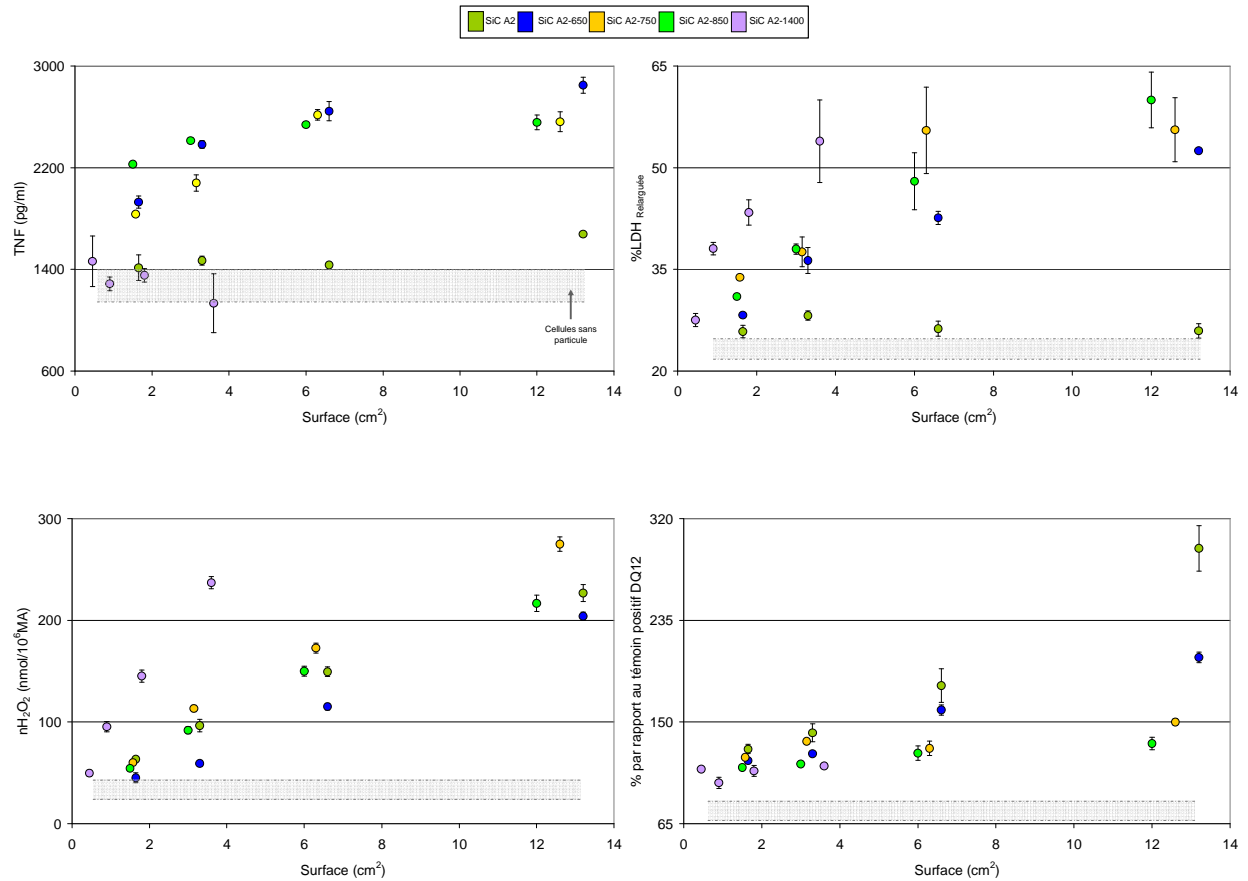


## ANNEXE G : RÉSULTATS DES TESTS IN VITRO EXPRIMÉS EN FONCTION DE LA SURFACE DES PARTICULES - PARTICULES OXYDEES DE SiC-

L'ensemble des résultats relatifs à l'évaluation de l'état d'inflammation (TNF- $\alpha$ ) de l'endommagement et mort cellulaire (LDH) et du stress oxydant ( $H_2O_2$ ) ont été exprimés en fonction de la surface des particules (Figure 122, Figure 123).



**Figure 122 : Ensemble des résultats des tests *In Vitro* sur les macrophages de lignée des particules industrielles oxydées de SiC A1 exprimés en fonction de la surface des particules**

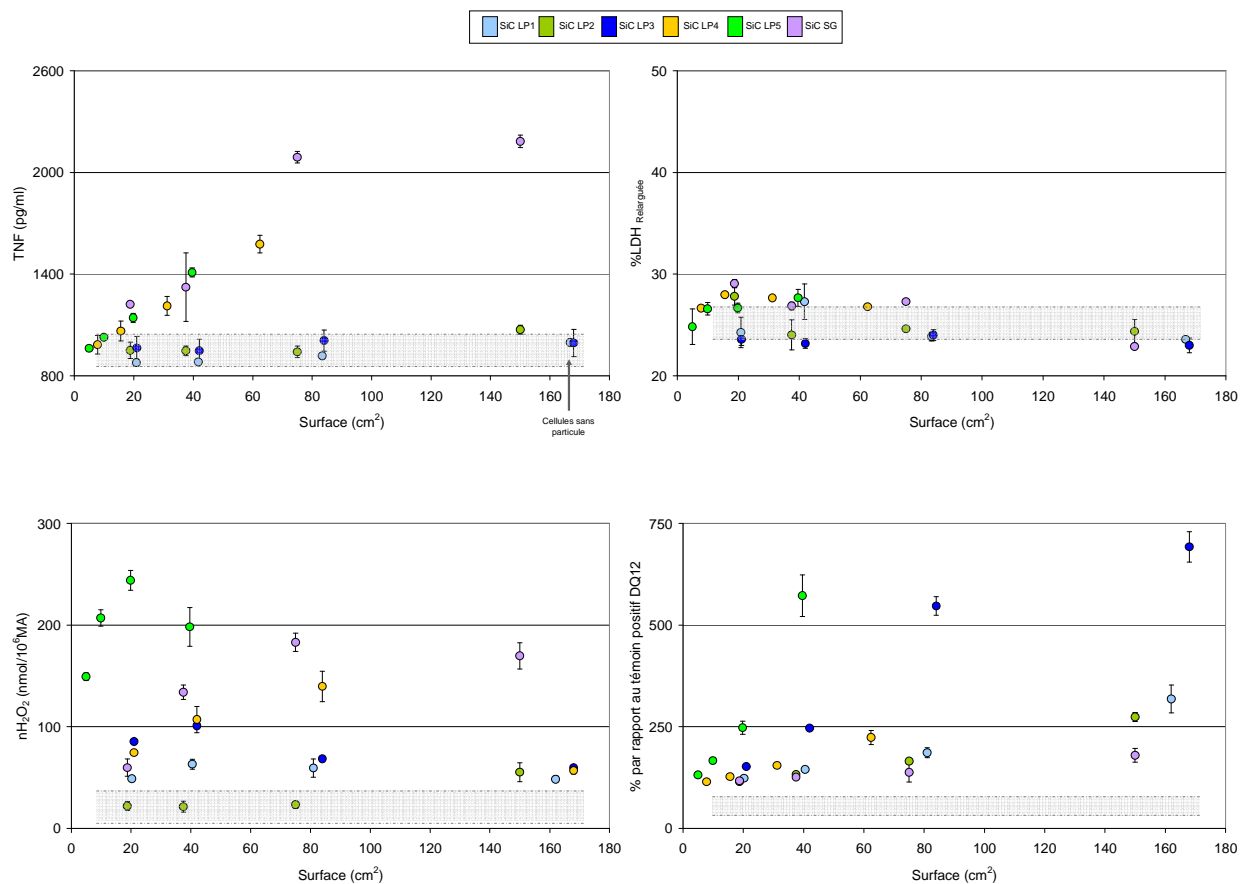


**Figure 123 : Ensemble des résultats des tests *In Vitro* sur les macrophages de lignée des particules industrielles oxydées de SiC A2 exprimés en fonction de la surface des particules**

Il semble que la surface soit un paramètre important du stress oxydant visible en particulier pour la poudre de SiC A2 (paramètre TOX) avec une diminution du signal en fonction de la surface des particules.

## ANNEXE H : RÉSULTATS DES TESTS IN VITRO EXPRIMÉS EN FONCTION DE LA SURFACE DES PARTICULES - NANOPARTICULES DE SiC-

L'ensemble des résultats relatifs à l'évaluation de l'état d'inflammation, de l'endommagement et mort cellulaire et du stress oxydant ont été exprimés en fonction de la surface des particules (Figure 124).



**Figure 124 : Ensemble des résultats des tests *In Vitro* sur les macrophages de lignée des nanoparticules de SiC synthétisées par pyrolyse laser (SiC LP) et voie sol-gel (SiC SG), exprimés en fonction de la surface des particules**

Aucune relation évidente entre la surface des nanoparticules et l'intensité de la réponse cellulaire (TNF- $\alpha$ , LDH, ROS, TOX) n'est observée.

**École Nationale Supérieure des Mines  
de Saint-Étienne**

N° d'ordre : 512 GP

Najih BOUMAHDI

Pluridisciplinary approach to study particles biological activity

**Speciality:** Process Engineering

**Keywords:** silicon carbide, physicochemical characterization, nanoparticles, Acheson process, laser pyrolysis, sol-gel, macrophage, RAW 264.7, biological activity, toxicity.

**Abstract:**

In the industry, silicon carbide (SiC) powders, dedicated for various applications (ceramic, abrasive, etc.), are principally synthesized with the Acheson process. During this process, powders undergo several operations and treatments during which many airborne particles can be generated in the work environment and cause a risk by inhalation. Up to now, SiC toxicity has been poorly investigated with difficulties to drawn clear conclusions. In a first part, biological activity of SiC powders synthesized by Acheson process has been investigated. Then, surface particles influence on cellular response has been studied by modifying it with oxidising thermal treatment. To finish and to complete the study, we enlarged this work to SiC nanoparticles, synthesized by laser pyrolysis and sol-gel method.

To evaluate SiC particles biological activity, *In Vitro* assays on macrophages (RAW 264.7) have been performed by studying different fields (inflammation state, cell damages and death, oxidative stress) in relation to particles physicochemical properties (size, specific surface area, morphology, crystallographic structure, chemistry, surface state, free radical activity).

Results, presented according to a vector model, show SiC particle influence on cellular response. Industrial SiC particles produced by Acheson process are mainly characterized by a moderated activity on inflammation, no cytotoxic effect and a strong impact on oxidative stress. Differences between coarse and fine particles have been observed with a strong capacity for SiC industrial powders to generate directly free radicals (HO•, COO•<sup>-</sup>). After surface modifications by oxidising thermal treatment, cellular response evolution is principally characterized by a strong increase of inflammation and cytotoxicity levels. Moreover, a strong impact on oxidative stress is observed with SiC nanoparticles, much more important than results obtained for industrial SiC particles.

**École Nationale Supérieure des Mines  
de Saint-Étienne**

N° d'ordre : 512 GP

Najih BOUMAHDI

Approche pluridisciplinaire de l'étude de l'activité biologique de particules fines

**Spécialité:** Génie des Procédés

**Mots clefs :** carbure de silicium, caractérisation physico-chimique, nanoparticules, procédé Acheson, pyrolyse laser, sol-gel, macrophage, RAW 264.7, activité biologique, toxicité.

**Résumé :**

Dans l'industrie, les poudres de carbure de silicium (SiC) sont élaborées principalement par le procédé Acheson. Durant ce procédé multi-étapes, les poudres subissent diverses opérations pouvant être à l'origine de la dissémination de poussières inhalables dans l'environnement de travail. Jusqu'à présent, la toxicité des poudres de SiC n'a été que très peu étudiée avec des résultats contradictoires soulignant l'intérêt d'évaluer l'activité biologique de poudres de SiC par une approche pluridisciplinaire. Dans une première partie, l'activité biologique de poudres de SiC produites industriellement par le procédé Acheson a été évaluée. Par suite, des modifications de la surface de ces particules par le biais de traitements thermiques oxydants ont permis de mettre en évidence l'influence de la surface des particules dans la réponse cellulaire. Pour finir et compléter l'étude, nous avons étendu le sujet au cas des nanoparticules de SiC, synthétisées par pyrolyse laser et voie sol-gel. Pour évaluer l'activité biologique des particules de SiC, des tests *In Vitro* sur des macrophages de culture (RAW 264.7) ont été réalisés en étudiant différents domaines de la réponse cellulaire (état d'inflammation, mort cellulaire, stress oxydant) en relation avec les propriétés physico-chimiques des particules (taille, surface, morphologie, structure cristallographique, chimie, état de surface, activité radicalaire).

Les résultats, illustrés suivant un modèle vecteur, soulignent que les particules industrielles de SiC sont principalement caractérisées par une activité modérée de l'état inflammatoire, aucun effet cytotoxique et un impact significatif sur le stress oxydant. Des différences en fonction de la taille des particules ont été observées ainsi qu'une forte capacité des particules à générer directement des radicaux libres (HO•, COO•). Après modification de la surface des particules par traitement thermique oxydant, la réponse cellulaire se caractérise par une forte augmentation de l'état d'inflammation et de la cytotoxicité. Enfin, un stress oxydant significatif est observé avec les nanoparticules de SiC, bien supérieur à celui observé avec les particules industrielles de SiC.