

Université Libre de Bruxelles

Institut de Gestion de l'Environnement et de l'Aménagement du Territoire

**TOXICOLOGIE EXPÉRIMENTALE
DES PARTICULES ULTRAFINES ATMOSPHÉRIQUES**

**Quels enseignements pour la toxicologie
des nanoparticules manufacturées ?**

**Mémoire de Fin d'Etudes présenté par
Virginie CRABBE,
en vue de l'obtention du grade académique de
Diplômé d'Etudes Spécialisées en Gestion de l'Environnement**

Année académique : 2006-2007

**Directeur : Prof. J. KUMMER
Assesseurs : Mme C. BOULAND
Prof. C. DE BROUWER
Prof. W. HECQ**

Remerciements

Mes remerciements iront tout d'abord au directeur de ce mémoire, Monsieur le Professeur Jacques Kummer pour sa disponibilité, sa grande gentillesse et ses conseils avisés.

Je remercie Madame Bouland pour ses encouragements.

J'adresse mes plus sincères remerciements à mon compagnon et à nos enfants qui ont dû subir mon indisponibilité durant de longs mois pour la réalisation de ce mémoire.

Enfin, j'exprime ma gratitude à mon entourage professionnel, pour son soutien inconditionnel et son aide précieuse.

Avant-propos

Ce mémoire de fin d'études est à situer dans le contexte global de la problématique des particules fines et ultrafines émises dans l'environnement et des impacts de celles-ci sur la santé humaine, dans une approche pluridisciplinaire.

Le sujet est tellement vaste qu'il permet la réalisation de trois mémoires différents et néanmoins complémentaires.

Olivier Regniers vise à établir un inventaire des méthodologies et des instruments actuellement disponibles pour la mesure des particules fines issues de moteurs diesel et à analyser leurs performances relatives à l'émission et à l'immission.

Gabriela Collado analyse les données européennes relatives aux particules fines et les impacts sur la santé sur base des études épidémiologiques réalisées à ce jour.

Pour ma part, ce travail tente d'évaluer la toxicologie des particules ultrafines sur base des études expérimentales chez l'animal avec, en parallèle, l'analyse des données toxicologiques disponibles pour les nanoparticules industrielles, qui participent à la même problématique.

Résumé

Les études toxicologiques et épidémiologiques attribuent des effets néfastes sur la santé publique à la matière particulaire de la pollution atmosphérique.

Les particules fines et particulièrement les particules ultrafines sont mises en cause dans l'augmentation de la morbidité et de la mortalité.

De nombreuses expériences *in vivo* réalisées sur des rongeurs confirment les résultats des études épidémiologiques qui montrent des effets sur le système respiratoire mais aussi sur le système cardiovasculaire.

Or, ces particules de petite taille sont mal prises en compte par les normes européennes en vigueur actuellement puisque ces normes sont fixées en terme de masse de particules et que les particules ultrafines ne représentent qu'une proportion extrêmement faible de la masse particulaire totale.

Le même problème du choix d'une métrique adaptée aux particules de très petite taille se pose pour les nanoparticules industrielles.

Les normes à l'immission des particules atmosphériques évoluent mais trop lentement car si aujourd'hui une norme s'applique aux PM_{10} et demain aux $PM_{2,5}$, la fraction ultrafine n'est toujours pas prise en compte.

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de normes concernant les particules ultrafines dont l'absence d'études épidémiologiques spécifiquement centrées sur celles-ci et le manque de techniques et d'instruments de mesure des particules ultrafines utilisables en dehors de certains laboratoires.

Des progrès dans le domaine de la métrologie des PUF sont donc indispensables, progrès qui bénéficieront aussi à une véritable détection des NP manufacturées en milieu environnemental et industriel et à une quantification de l'exposition des travailleurs, des consommateurs et de la population en général.

Les progrès à réaliser sont d'autant plus urgents que le domaine des NP est en plein essor avec des productions industrielles de plusieurs centaines ou plusieurs milliers de tonnes pour certaines NP alors que dans le même temps, les effets sur la santé et l'environnement ont été très peu établis.

Or, les caractéristiques physico-chimiques communes aux particules ultrafines de la pollution atmosphérique et aux nanoparticules manufacturées, et les données toxicologiques expérimentales de ces particules ultrafines libérées dans l'atmosphère doivent inciter à la prudence quant à la diffusion et à l'utilisation des nanoparticules industrielles afin de maîtriser les risques potentiels.

En conclusion, si les normes doivent évoluer, sachons que de nombreuses années seront encore nécessaires pour que les normes concernant les particules de taille nanométrique apparaissent, après le développement d'instruments adaptés, de méthodes de références et d'études épidémiologiques spécifiques aux particules ultrafines.

TABLE DES MATIERES

<i>Avant-propos</i>	4
1. Introduction	7
2. Matière particulaire et particules ultrafines	9
2.1. Définition et classification des particules.....	9
2.2 Sources des particules atmosphériques	10
2.3 Mécanismes d'élimination des particules	12
2.4 Caractérisation des particules ultrafines.....	12
2.4.1 Nature physique.....	14
2.4.2 Déplacement et transfert dans l'air.....	14
2.4.3 Mise en suspension.....	15
2.4.4 Dynamique dans l'air	15
2.5 Métrologie des particules ultrafines	16
3. Nanoparticules manufacturées	18
3.1 Propriétés des nanomatériaux.....	19
3.2 Classification des nanomatériaux.....	21
3.3 Méthodes de production des nanomatériaux	24
4. Approche physiologique du comportement des particules de taille nanométrique	25
4.1 Exposition.....	25
4.1.1 Comportement des particules de taille nanométrique	25
4.1.2 Exposition des travailleurs	26
4.1.3 Exposition de la population.....	28
4.2 Distribution.....	31
4.2.1 L'appareil respiratoire	31
4.2.2 L'appareil digestif	33
4.2.3 La surface cutanée.....	33
5. Toxicologie des PUF et des NP manufacturées	35
5.1 Introduction	35
5.2. Toxicologie des PUF : études expérimentales	37
5.2.1 Contexte	37
5.2.2 Etude de la translocation	38
5.2.3 Etude de l'inflammation pulmonaire et de l'évolution de la thrombose induite.....	39
5.3. Toxicologie des nanoparticules manufacturées.....	48
5.3.1 Déterminants possibles des effets toxiques.....	48
5.3.2 Mécanismes toxiques potentiels.....	50
5.3.3 Effets toxiques des NP	50
6. Particules ultrafines, nanoparticules manufacturées et environnement	56
6.1 Effets des PUF sur l'environnement	56
6.2 Effets des nanoparticules manufacturées sur l'environnement	57
6.2.1 Dispersion des NP dans le milieu naturel.....	57
6.2.2 Ecotoxicité des NP	59
6.3 Détection des nanoparticules dans l'environnement	59
6.3.1 Détection des NP dans l'air	59
6.3.2 Détection des NP dans les eaux.....	60
6.3.3 Détection des NP dans les sols.....	60
7. Conclusions et perspectives	62
Bibliographie	66

1. Introduction

« La pollution atmosphérique peut tuer »¹.

En effet, on sait depuis longtemps que l'inhalation de polluants, dispersés dans l'air sous forme de gaz ou de particules (on parle alors d'aérosols) et contenant des substances nocives ou toxiques, peut être à l'origine de diverses pathologies chez l'Homme, avec des conséquences plus ou moins graves voire mortelles selon les conditions d'exposition.

Durant le vingtième siècle, plusieurs épisodes dramatiques ont mis en évidence les risques des polluants urbains, par exemple le « smog » de décembre 1952 à Londres qui a provoqué, en 4 jours, 4000 décès de plus qu'attendu.

La recherche de corrélation entre mortalité ou morbidité, et variations de concentrations de particules et autres polluants atmosphériques, a constitué un premier lien entre polluants atmosphériques et effets sur la santé avec pour conséquence la fixation de normes environnementales.

Aujourd'hui, une part importante de la population générale semble prendre conscience du danger que représente la pollution atmosphérique, grâce à la diffusion dans les médias d'informations scientifiques peu connues auparavant.

Le 7 mai 2004, le Figaro, par exemple, titrait : « les particules fines tueraient plus de 6000 français par an ». L'article mentionnait la pollution atmosphérique urbaine liée pour une bonne part aux rejets polluants des véhicules et l'augmentation mesurable des décès par cancer du poumon et par maladies cardio-respiratoires chez les plus de 30 ans.

Cette prise de conscience du grand public fut précédée par celle du monde scientifique, fort peu médiatisée celle-là, suite à de nombreuses études épidémiologiques (Atkinson et coll., 1999 ; Dockery et coll., 1993 ; Pope et coll., 1991, 1995, 2002).

Pourtant, dès les années 90, les dangers des **particules ultrafines** avaient été signalés par l'un des meilleurs spécialistes mondiaux de la pollution particulaire dans le domaine expérimental (Oberdörster et coll., 1990, 1991, 1995).

Mais ne nous ne méprenons pas, l'Homme vit en permanence et depuis toujours dans une atmosphère chargée de matières particulaires, qu'elles soient d'origine naturelle (poussières de sable, de sel marin, d'origine végétale, émises lors d'incendies ou d'éruptions volcaniques) ou liées à des activités humaines (feu de bois, poêle à charbon, condensation de gaz d'échappement des véhicules à moteur, chauffage urbain...).

Cependant, le développement de l'industrialisation et l'évolution de notre mode de vie ont multiplié et intensifié les sources de particules pour la population générale. Ainsi, en milieu rural ou en milieu urbain, chaque litre d'air inspiré contient de 10^3 à 10^5 PUF/cm³ (Zhu et coll., 2002), et parfois plus, en zone urbaine fortement polluée par exemple.

Depuis des décennies, nous connaissons des maladies pulmonaires plus ou moins graves, dues à l'inhalation de poussières de taille micrométrique (entre 1 et 100 µm), particulièrement en milieu professionnel comme les pneumoconioses, les cancers broncho-pulmonaires, les cancers de la plèvre, etc. Certaines poussières ont démontré leur toxicité dans ces pathologies : poussières de fer, de charbon, de silice, d'amiante, etc.

Comme mentionné précédemment, depuis une dizaine d'années, des données issues de l'épidémiologie environnementale et de la toxicologie expérimentale tendent à prouver que ce sont

¹ Cette phrase est la première de l'article « De la nécessité de faire le point sur le danger des particules ultrafines » rédigé par Benoît HERVE-BAZIN, directeur scientifique à l'INRS (Hygiène et sécurité au travail-Cahier de notes documentaires-4^{ème} trimestre 2004-197/53.

les particules ultrafines (diamètre inférieur à 0,1 µm), produites de manière non intentionnelle, qui pourraient avoir une toxicité spécifique, en raison de leur dimension nanométrique.

Il pourrait en être de même pour les nanoparticules manufacturées produites, elles, de manière intentionnelle, pour leurs propriétés nouvelles dont on pressent qu'elles pourraient être à l'origine d'une toxicologie nouvelle.

Les prévisions d'une forte croissance de la recherche et des applications industrielles dans le domaine des nanomatériaux, pour les années à venir, s'accompagnent d'une crainte que ces matériaux puissent se révéler dangereux pour la santé, d'abord pour les travailleurs employés dans ces activités au sein des laboratoires de recherche et des industries de fabrication, et ensuite pour la population générale si la diffusion des nanomatériaux à grande échelle se produit comme prévu.

Il a fallu de nombreuses années pour que les autorités européennes prennent en compte les résultats des études épidémiologiques concernant les impacts négatifs des particules atmosphériques sur la santé de la population exposée et imposent des normes avec des valeurs limites d'immission afin de garantir une certaine qualité de l'air pour les citoyens européens.

La Directive-cadre pour la qualité de l'air apparaît en 1996 et la première directive-fille en 1999, pour la matière particulaire.

La valeur limite imposée alors concerne uniquement les PM₁₀² alors que l'OMS³ considère déjà les PM_{2,5} comme de meilleurs indicateurs pour apprécier les effets des particules sur la santé.

C'est pourquoi, G. Collado, après avoir passé en revue de nombreuses études épidémiologiques dans le cadre de son mémoire, pose la question de la révision des normes européennes définies pour la matière particulaire.

Néanmoins, en partie sous la pression des scientifiques affectés aux Groupes de Travail de la Commission européenne, les normes évoluent mais lentement.

Aussi, une nouvelle directive devrait-elle être approuvée en décembre 2007, directive qui tient compte, pour la première fois, des PM_{2,5} même si de nombreux scientifiques contestent déjà la pertinence de la valeur limite proposée.

En effet, la faible valeur des risques sur le plan individuel, par rapport à d'autres risques, ne doit pas occulter le fait que c'est toute la population qui est exposée et en permanence. Aussi, des modifications, mêmes mineures, des niveaux de pollution atmosphérique peuvent avoir un impact significatif sur la santé publique.

Force est de constater que ces nouvelles normes ne tiendront pas compte des particules ultrafines, malgré les nombreuses études expérimentales (détaillées dans le chapitre 5) qui démontrent la toxicité spécifique de la fraction ultrafines des particules atmosphériques.

Le développement de la métrologie des particules ultrafines devrait permettre la réalisation de nouvelles études épidémiologiques, centrées sur la fraction ultrafine de la pollution atmosphérique, afin de faire évoluer à nouveau les indicateurs et les valeurs limites des normes d'immission.

Les nouvelles connaissances métrologiques et toxicologiques des particules ultrafines, produites de manière involontaire par les activités humaines, bénéficieront aussi à une meilleure connaissance des nanoparticules manufacturées.

² PM₁₀ : Particules de 2,5 à 10 µm.

³ OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

2. Matière particulaire et particules ultrafines

Ces aspects ont déjà été très bien développés par les deux autres membres du trio (G.Collado et O.Regniers) dans le cadre de l'approche globale du travail consacré aux particules atmosphériques, à leurs mesures et à leurs impacts.

Les caractéristiques de la matière particulaire seront résumées dans ce chapitre pour permettre, éventuellement, la lecture de ce travail de manière indépendante des deux autres mémoires.

2.1. Définition et classification des particules

La matière particulaire, présente dans notre atmosphère, est constituée d'un mélange complexe de particules dont la taille s'étend de quelques nanomètres jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres. Dans ce cas, on parle d'**aérosol polydispersé** par opposition à l'**aérosol monodispersé** constitué de particules de dimension uniforme.

Les termes de « matière particulaire » (traduit de l'anglais « particulate matter » ou PM), « poussières en suspension » ou « particules » sont des synonymes désignant les polluants de taille microscopique en suspension dans l'air.

➤ Classification des particules en fonction de la taille

Les particules ayant des formes et des densités variées, on utilise le concept de **diamètre aérodynamique**⁴ pour les classer.

Pour définir les différents ordres de grandeur des particules, la division la plus communément appliquée est basée sur la limite de 2,5µm, comme convention de mesure, entre **particules fines ou PM_{2,5}** (< 2,5 µm) et **particules grossières ou PM₁₀** (2,5-10 µm).

Les particules d'une taille inférieure à 100 nm ou 0,1µm sont appelées **particules ultrafines ou PM_{0,1}**, parfois aussi **nanoparticules** ou encore particules submicroniques.

Remarquons qu'il existe une certaine confusion dans la définition des particules ultrafines (ou **PUF**) et des nanoparticules (**NP**) dans la littérature d'avant 2001. Dans leurs textes, G. Collado et O. Regniers ont choisi de faire référence aux définitions suivantes, à savoir :

- particules ultrafines (PUF) : particules d'un diamètre inférieur à 100 nm.
- nanoparticules : particules d'un diamètre inférieur à 50 nm.

Dans le présent travail, les termes « particules ultrafines » et « nanoparticules » désigneront, comme dans la majorité des publications, les particules dont la gamme de taille se situe entre 1 et 100 nm.

Pour la clarté de l'exposé, la distinction entre PUF et NP portera ici sur l'origine des particules, à savoir, produites involontairement par combustion pour les PUF ou intentionnellement par des méthodes industrielles pour les NP.

➤ Classification des particules en fonction des mécanismes de leur formation

La distribution granulométrique des particules est divisée en trois modes correspondant aux pics observés dans cette distribution :

⁴ Le diamètre aérodynamique correspond au diamètre qu'une particule sphérique de densité de 1g/cm³ doit avoir pour présenter la même vitesse de chute dans l'air calme que la particule considérée.

- **mode de nucléation** : ce mode regroupe principalement les *PUF* (diamètre aérodynamique inférieur à 100 nm) formées par nucléation de gaz atmosphériques dans des conditions de sursaturation.
- **mode d'accumulation** : ce mode comprend surtout des *particules fines* (diamètre entre 100 nm et 2,5 µm) provenant de réactions de conversion de gaz-particule, de la condensation de gaz sur des particules et de la coagulation entre particules.
- **mode grossier** : dans ce mode, les *particules grossières* (diamètre entre 2,5 µm et 10 µm) sont générées par des processus anthropiques (abrasion mécanique) et par des sources naturelles (sel marin...)

➤ Classification en fonction du niveau de pénétration dans le système respiratoire

- **fraction inhalable** : ces particules dont le diamètre se situe entre 5 et 10 µm s'accumulent dans la cavité nasale et la gorge.
- **fraction thoracique** (ou trachéo-bronchique) : ces particules d'un diamètre de 1 à 5 µm se déposent dans la trachée, les bronches et les bronchioles.
- **fraction alvéolaire** (ou respirable) : ce sont les particules les plus petites (entre 100 nm et 1 µm) qui atteignent les alvéoles pulmonaires.

2.2 Sources des particules atmosphériques

Les particules présentes dans l'air ambiant proviennent de sources **naturelles** (sels marins, éruptions volcaniques, ...) et **anthropiques** (combustion de carburants fossiles, activités agricoles, processus industriels, ...).

Nous distinguerons les particules **primaires** des particules **secondaires**, toutes deux issues de sources naturelles et anthropiques.

Les premières sont émises directement de la source dans l'air ambiant sous forme liquide ou solide. Les particules secondaires, elles, sont formées dans l'atmosphère par des processus physico-chimiques à partir de précurseurs gazeux tels que le dioxyde de soufre (SO₂), les oxydes d'azote (NO_x), l'ammoniac (NH₃) et les composés organiques volatils (COV) provenant de sources naturelles et anthropiques.

En milieu urbain, les particules secondaires (ou aérosols secondaires) sont essentiellement le résultat de la transformation des NO_x émis par la circulation automobile et du SO₂ provenant des combustibles contenant du soufre.

Dans la production des particules grossières, les sources naturelles (les poussières minérales en particulier) sont dominantes en termes de masse.

Les sources dominantes de particules fines comprennent les émissions primaires anthropiques provenant des processus de combustion et la formation secondaire d'aérosols issus de l'oxydation de composés organiques et de SO₂.

Les sources de particules, pour l'ensemble des secteurs et par secteur, sont résumées ci-dessous.

➤ Pour l'ensemble des secteurs :

La contribution des différents secteurs à la formation des matières particulaires d'origine anthropique est répartie entre les secteurs du transport, de l'industrie, de l'agriculture et le secteur domestique (résidentiel et commercial).

En général, un type de source est associé à l'émission d'une certaine taille de particules, les particules fines étant davantage associées à des processus de combustion et les particules grossières à l'abrasion mécanique. Mais globalement, les différents secteurs contribuent autant à la fraction fine qu'à la fraction grossière.

Les principaux émetteurs d'émissions anthropiques de PM_{2,5} sont les secteurs des transports, domestique et industriel (y compris la production d'énergie) à cause des processus de combustion. Chaque secteur contribue pour une part située entre un quart et un tiers aux émissions primaires de particules fines.

Les activités agricoles sont surtout responsables des émissions de PM₁₀. Tous les secteurs émettent des gaz précurseurs de type SO₂, NO_x, COV et NH₃.

➤ Par secteur :

Le **secteur du transport** est un important émetteur de particules fines, particulièrement à cause des moteurs diesel, mais aussi de particules grossières produites par abrasion mécanique des surfaces carrossables.

Dans le **secteur industriel**, la consommation d'énergie et/ou la production d'énergie constituent des sources importantes de particules primaires. Le type de combustible utilisé dans le processus de combustion détermine la distribution en taille des particules.

Dans les fonderies, les particules primaires sont en majorité des particules fines. Les autres sources émettent principalement des particules grossières.

Le **secteur domestique** produit autant de PM_{2,5} que de PM₁₀, à cause du processus de combustion pour le chauffage.

Enfin, le **secteur agricole** génère des particules anthropiques secondaires par la production de précurseurs, principalement l'ammoniac (NH₃) et d'autres composés azotés (NO_x). Ce secteur émet aussi des quantités importantes de particules primaires (poussières de terre, brûlis, gaz de machines motorisées...).

Des données de l'OMS (2006) indiquent une réduction significative des émissions totales de particules en Europe pour la période 1990-2000, réduction due principalement à la diminution de la contribution du secteur industriel. Cette baisse concerne surtout les fractions grossières des particules (TSP⁵ et PM₁₀).

Dans le même temps cependant, l'OMS observe une augmentation significative de la contribution du secteur des transports, avec comme conséquence une contribution plus importante aux émissions de particules fines.

La situation est d'autant plus préoccupante que, non seulement le transport routier (et donc les motorisations diesel) continue à se développer, mais aussi l'usage accru des véhicules individuels avec, de plus, une augmentation particulièrement importante des parts de marché des moteurs diesel, comme le confirment les chiffres de la FEBIAC⁶ ci-dessous, dans les tableaux 1 et 2.

Evolution du parc des voitures par type de carburant

	ESSENCE	DIESEL	LPG
1996	66 %	33 %	0,4 %
2006	46 %	52 %	1,0 %

Tableau 1 (Source : FEBIAC, 2007)

⁵ TSP (Total Suspended Particles) : masse totale de particules présentes dans l'air ambiant incluant toutes les particules, même au-delà des PM₁₀.

⁶ FEBIAC : FÉdération Belge de l'Industrie de l'Automobile et du Cycle.

Immatriculation de voitures neuves par type de carburant

	ESSENCE	DIESEL	LPG
1996	54 %	46 %	0,0 %
2006	25 %	75 %	0,1 %

Tableau 2 (Source : SPF Mobilité et Transports-FEBIAC, 2007)

Or, le moteur diesel rejette plusieurs centaines de fois plus de particules qu'un moteur à essence et plus d'oxyde d'azote (NO_x), produisant, et les particules primaires, et les précurseurs des particules secondaires !

2.3 Mécanismes d'élimination des particules

Trois mécanismes contribuent à éliminer les particules de l'atmosphère en fonction de leur taille :

➤ la sédimentation

Ce mécanisme engendre des dépôts secs et constitue le mode d'élimination majeur de la fraction grossière des particules. Celles-ci possèdent un temps de résidence court dans l'atmosphère, de quelques minutes à quelques jours.

➤ la diffusion

A cause de leur petite taille, les PUF sont essentiellement éliminées par diffusion vers la surface terrestre ou diffusion et coagulation avec de plus grandes particules ou encore diffusion et croissance par condensation de gaz atmosphériques.

Le temps de résidence de ces particules est également court, de quelques minutes à quelques jours.

➤ les précipitations

Les précipitations engendrent des dépôts humides pour les particules fines qui ne sont éliminées efficacement ni par sédimentation, ni par diffusion et tendent à demeurer plus longtemps dans l'atmosphère, de quelques jours à quelques semaines.

Ces mécanismes sont également appelés « puits ».

2.4 Caractérisation des particules ultrafines

Le mécanisme « conversion gaz-particule » issu de la phase gazeuse est à l'origine de la formation des PUF dans l'air. Les PUF étant une composante de l'aérosol atmosphérique, elles sont présentes partout : dans l'atmosphère générale, en zone urbaine, dans l'air intérieur des habitations et des lieux de travail.

Leur présence dans l'*environnement* est essentiellement due au phénomène de combustion qui, au travers des réactions de nucléation et de condensation de gaz et vapeurs, produit des PUF en grand nombre. Leurs concentrations sont plus élevées à proximité des grands axes routiers ou dans les tunnels (Zhu et coll., 2002 ; Abu-Allaban et coll., 2002).

La figure 1, ci-dessous, illustre la **distribution granulométrique** caractéristique de l'aérosol en zone urbaine. Nous voyons que la distribution en taille s'étale sur plusieurs ordres de grandeur, que les PUF dominant en nombre, contribuent de manière importante au mode « surface » mais nettement moins au volume ou à la masse.

Tout comme pour l'environnement, les aérosols ultrafins dans l'*atmosphère de travail* sont associés aux phénomènes de nucléation et de condensation, produits par les technologies conventionnelles dont le soudage, le meulage, le ponçage, la dégradation thermique de polymères ou de plastiques, etc.

Dans tous les domaines de l'environnement ou du travail, la **métrologie**⁷, et les méthodes utilisées habituellement pour les aérosols, ne sont pas adaptées à la fraction ultrafine et ne permettent pas de mesurer et de caractériser correctement l'aérosol ultrafin.

La caractérisation des PUF demande une instrumentation propre et des méthodes différentes de celles utilisées habituellement pour les particules fines et grossières. L'instrumentation devrait, idéalement, répondre à de nombreuses spécificités : diamètre pertinent des particules, gamme de concentration, gamme de taille des particules, évolution temporelle, accessibilité, etc.

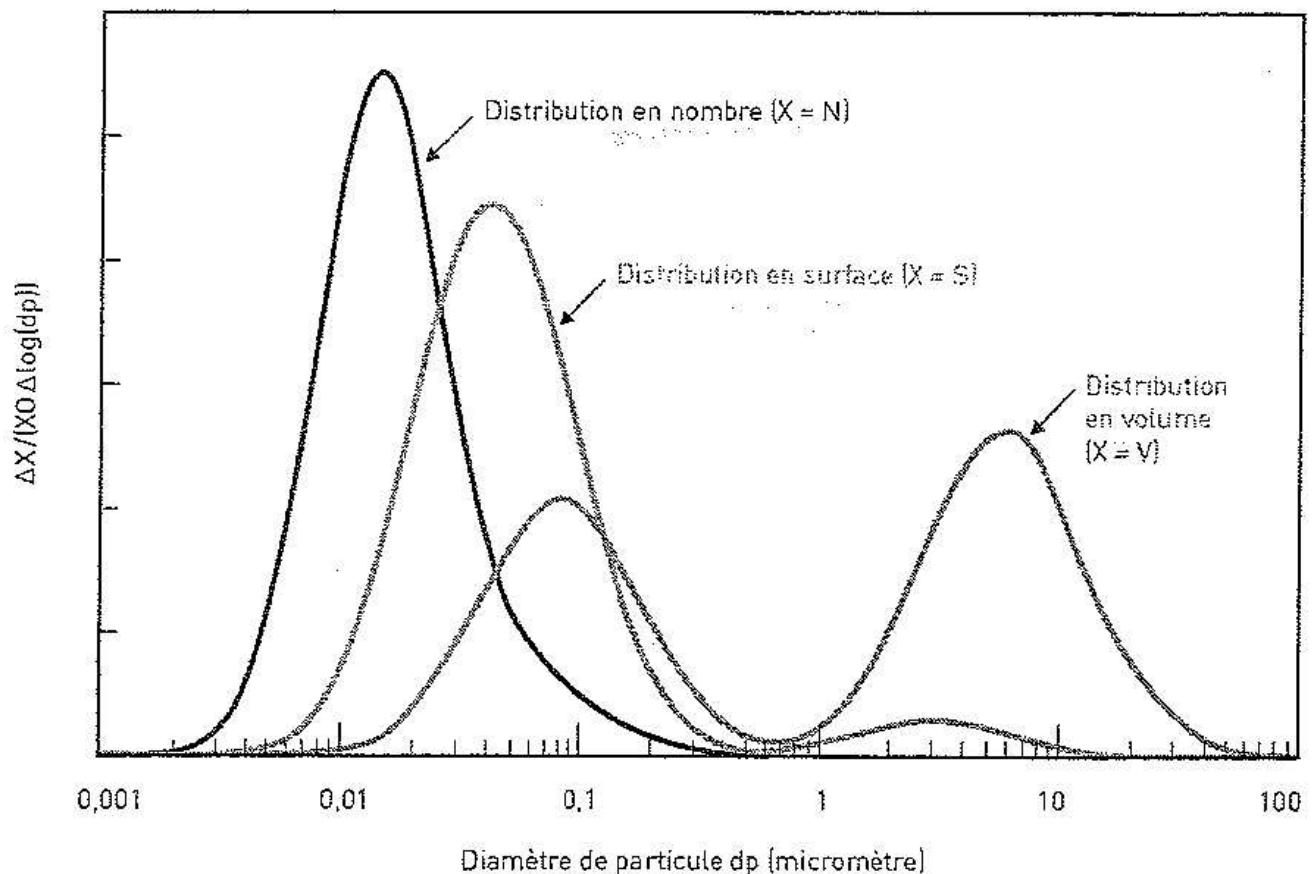


Figure 1

Distributions granulométriques moyennes caractéristiques de l'aérosol atmosphérique en environnement urbain suivant les trois modes de représentation en nombre, surface et volume. (Witschger O et Fabriès JF, 2005).

La métrique, avec laquelle l'exposition aux particules doit être caractérisée pour être pertinente, constitue un point-clé de la mesure des PUF. Aujourd'hui, les résultats des études épidémiologiques et toxicologiques indiquent que parmi les trois métriques d'exposition, à savoir masse, surface et nombre des particules, la métrique « surface » semble la plus appropriée, suivie par la métrique « nombre de particules » en terme de pertinence.

Mais il n'existe pas encore d'instrumentation qui, dans la pratique, rencontre cette demande. La métrique « masse », elle, n'est pas en mesure de caractériser les PUF

⁷ Métrologie : ensemble des techniques de mesure

2.4.1 Nature physique

Une particule suffisamment grosse peut être considérée comme une entité dont les propriétés physiques et chimiques découlent de celles du matériau constituant.

Lorsque la taille diminue pour atteindre une dimension nanométrique, avec une taille dont la limite supérieure est de l'ordre de 100 nm, comme pour les PUF, le nombre relativement faible de molécules ou d'atomes contenus dans une particule conduit à des **propriétés nouvelles**.

Dès lors que les effets de surface deviennent non négligeables vis-à-vis des effets de volume, de nouveaux concepts issus de la **mécanique quantique** seront utilisés pour décrire ces nouvelles propriétés.

Dans ce cas, le rapport surface/volume et la proportion de molécules présentes en surface évoluent en fonction du diamètre de la particule, les deux facteurs en question augmentant significativement lorsque le diamètre de la particule diminue.

Ainsi, pour une particule de 500 nm, la proportion de molécules en surface est de moins de 1% tandis que pour une particule de 5 nm, cette proportion est de 50%.

Ceci ne sera pas sans conséquence sur l'activité de surface de très petites particules car l'énergie de surface augmente avec la surface spécifique qui est inversement proportionnelle à la taille de ces particules.

La grandeur de la **surface active** (c'est-à-dire la fraction de la surface géométrique directement accessible de l'extérieur) détermine les cinétiques d'adsorption et influence les réactions chimiques entre les particules et la phase gazeuse environnante.

Précisons également qu'une énergie de surface importante rend la particule instable sur le plan thermodynamique et que le potentiel chimique varie avec la courbure de la surface.

Voilà pourquoi ces changements de taille, à un niveau nanométrique, entraînent des changements importants du point de vue des propriétés physiques et chimiques, comparés aux propriétés des mêmes matériaux mais à l'échelle macroscopique (Preining O., 1998).

Les propriétés des PUF et des particules nanométriques ne sont donc pas comparables aux propriétés du matériau constitutif, et il semble que ces propriétés évoluent avec la taille des particules considérées.

Par conséquent, la façon dont ces particules vont interagir avec leur environnement, physiquement, chimiquement ou **biologiquement**, pourra être modifiée de manière importante. Un bon exemple est celui de l'or, matériau connu pour sa stabilité, qui devient réactif aux dimensions nanométriques.

En conclusion, retenons que la **surface** très importante des PUF constitue une interface de choix pour des réactions avec des cibles biologiques.

2.4.2 Déplacement et transfert dans l'air

La **diffusion** (encore appelée diffusion brownienne) constitue le mécanisme primaire de transport des particules composant un aérosol ultrafin.

Le tableau 3 illustre l'importance relative du phénomène de diffusion par rapport au phénomène de sédimentation en fonction du diamètre des particules.

Les résultats montrent qu'en deçà de 100 nm (ou 0,1µm), le mouvement des PUF est dominé par le phénomène de diffusion.

Tableau 3

D_p (µm)	X_{DT} (mm)	X_G (mm)
0,01	3,3 10 ⁻¹	6,8 10 ⁻⁵
0,1	3,7 10 ⁻²	8,7 10 ⁻⁴
1	7,4 10 ⁻³	3,5 10 ⁻²
10	2,2 10 ⁻³	3,1

Mesures de la diffusion thermique (X_{DT}) et de la gravité (X_G) pour des particules sphériques de diamètre D_p et de masse volumique 1g/cm³. Calculs effectués dans l'air aux conditions standards.

Source : INRS-Hygiène et sécurité du travail-Cahiers de notes documentaires-2^e trimestre 2005-199.

Insistons sur le fait que la diffusivité élevée de ces particules influencera leur dépôt dans les voies respiratoires.

2.4.3 Mise en suspension

La mise en suspension dans l'air, d'aérosols, à partir de poudres provenant de matériaux pulvérulents, a été particulièrement bien étudiée dans l'atmosphère de travail.

Cependant, le principe peut s'appliquer à toutes les atmosphères. Une fois dans l'air, les particules en contact les unes avec les autres, adhèrent entre elles, formant des **agglomérats**. Ces particules restent « collées » les unes aux autres sous l'effet de forces cohésives et surtout sous l'effet des forces de Van Der Waals qui empêchent l'agglomérat de se rompre.

Ainsi, une partie importante des particules individuelles mises en suspension, va former des agglomérats qui peuvent encore, dans certaines conditions, se séparer à nouveau, à la différence des **agrégats**, qui se séparent difficilement, leurs particules étant fortement liées.

2.4.4 Dynamique dans l'air

Une fois dans l'air, le devenir d'un aérosol de particules ultrafines sera déterminé par un mécanisme inter-particulaire appelé « **coagulation** ».

Le phénomène est dû au mouvement relatif des particules qui entrent en collision puis restent groupées sous l'effet de forces d'adhérence pour former des particules plus grosses. On distingue la coagulation thermique, résultat du mouvement brownien des petites particules, de la coagulation cinématique, pour des particules plus grosses où le mouvement relatif des particules est soumis à la sédimentation.

Le mécanisme de coagulation mène à une décroissance continue de la concentration en nombre de particules associée à une augmentation de la taille moyenne des particules formant l'aérosol.

Le tableau 4 montre l'évolution d'un aérosol polydispersé monomodal en fonction du temps sous l'effet de la coagulation thermique ci-dessous.

Tableau 4

t (s)	DMN (µm)	CN/CN ₀ (%)
0	0,05	100
30	0,11	21
120	0,18	7
240	0,23	4

t = temps ; DMN =Diamètre Médian en Nombre ; CN = Concentration Numérique ; CN₀ = 10⁸p/cm³

Source : INRS-Hygiène et sécurité du travail-Cahiers de notes documentaires-2^e trimestre 2005-199.

Les résultats du tableau 4 montrent que les caractéristiques de l'aérosol évoluent rapidement et qu'après 2 minutes, la concentration numérique CN ne représente plus que quelque % de la concentration d'origine CN₀. L'aérosol final se compose alors de particules plus grosses, avec un diamètre supérieur à 100 nm pour la plupart des particules, qui restent cependant submicroniques.

Aussi, ces résultats nous amènent à tenir compte de la distance d'émission de l'aérosol et donc de son temps de transfert car, si à proximité immédiate de la source, la présence de PUF est évidente, cette présence sera bien moins évidente au-delà d'une certaine distance et d'un certain temps de transfert.

Par conséquent, si la concentration en nombre de PUF constitue une métrique pertinente concernant les effets sur la santé, la persistance dans l'air des particules entre le ou les points d'émission et l'inhalation devient un paramètre critique pour l'évaluation du risque.

La nécessité de disposer d'outils métrologiques⁸, mesurant la granulométrie et la concentration mais aussi l'évolution dans le temps des deux paramètres, apparaît clairement afin de caractériser une pollution de type PUF.

2.5 Métrologie des particules ultrafines

Le développement de la **métrologie**⁹ des particules ultrafines est principalement dû, depuis quelques années, aux études sur l'aérosol atmosphérique, les émissions des moteurs et, plus récemment, les nanotechnologies. La mesure des aérosols ultrafins en atmosphère de travail est une préoccupation plus récente.

La métrologie est essentielle pour la connaissance des particules de taille nanométrique car elle doit permettre de caractériser l'ensemble des propriétés physiques et chimiques de ces particules.

De façon générale, la concentration de la métrique considérée (nombre, surface ou masse) dans l'air est obtenue par une mesure globale ou par une mesure pour différentes classes de taille. Pour la plupart des méthodes, un prélèvement actif (à l'aide d'une pompe) permet la mesure des particules qui sont transportées au niveau d'un détecteur ou déposées sur un support.

L'**échantillonnage** est à réaliser avec précaution car il peut modifier considérablement les caractéristiques de l'aérosol mesuré selon la technique considérée. Connaître ou évaluer les biais induits par l'échantillonnage est particulièrement important pour évaluer correctement les résultats des mesures.

Les techniques et méthodes disponibles à ce jour pour la mesure, dans l'air, de la concentration en nombre (particules/cm³), de la concentration en surface (µm²/cm³) et de la concentration en masse (mg/m³) ont été décrites avec précision et abondamment commentées par O. Regniers dans son mémoire intitulé « Les particules ultrafines : techniques de mesure à l'émission et à l'immission ».

Ce travail met en évidence les limites des techniques de mesure actuelles, limites qui constituent un frein à la réalisation d'études épidémiologiques et expérimentales.

⁸ Métrologique : destiné à effectuer des mesures

⁹ Métrologie: ensemble des techniques de mesure

Pour la suite de l'exposé, nous retiendrons, de manière extrêmement résumée, qu'il existe trois catégories d'appareils :

- a.** Appareils de mesure non-spécifique, par comptage des particules ou par granulométrie.
Les appareils mesurent l'ensemble des particules en présence, sans distinguer les sources.
- b.** Appareils de mesure spécifique afin de caractériser précisément une source de particules ultrafines, essentiellement par analyse différée dans le temps.
- c.** Appareils de détection indirecte par traçage, c'est-à-dire par marquage préalable des particules permettant ensuite la détection de ces particules.

3. Nanoparticules manufacturées.

Les **nanoparticules manufacturées** (engineered nanoparticles, en anglais), sont produites de façon volontaire afin de développer des matériaux nouveaux présentant des propriétés particulières. On distingue les nanoparticules manufacturées *libres* (engineered free nanoparticles), pouvant être dispersées dans l'air, des nanoparticules manufacturées fixées dans une *matrice*, solide ou liquide.

Ces matériaux nouveaux sont regroupés sous le terme de « **nanomatériaux** » et issus de procédés permettant la structuration de la matière au niveau atomique, moléculaire ou supramoléculaire à une échelle caractéristique inférieure à 100 nm.

A l'échelle de quelques dizaines, voire de quelques nanomètres, de nouveaux comportements de la matière apparaissent, comportements qui répondent alors aux lois de la physique quantique. C'est ainsi que de nouvelles propriétés biologiques, chimiques et physiques se manifestent. Ces nouvelles propriétés entraînent le développement de recherches intenses et de nombreuses applications industrielles et médicales dont certaines sont révolutionnaires.

Les experts estiment que les nanotechnologies vont modifier de façon importante les procédés de fabrication de nombreuses industries à moyen terme, c'est-à-dire dans un délai de 5 à 15 ans, pour améliorer les performances de produits comme l'électronique, les écrans, les peintures, les batteries, les capteurs ou les catalyseurs.

Les nanomatériaux pourraient permettre la fabrication d'implants médicaux biocompatibles et résistants à la bio-corrosion ou de valves cardiaques artificielles légères et chimiquement stables.

Des nano-membranes pourraient fournir de nouveaux procédés de purification de l'eau.

Aussi, la découverte des nanomatériaux constitue-t-elle plus que probablement un tournant majeur dans le développement industriel du XXI^{ème} siècle.

Les experts recommandent de faire la distinction entre nanosciences et nanotechnologies :

- Les **nanosciences** sont définies comme l'étude des phénomènes et la manipulation de matériaux aux échelles atomique, moléculaire et macromoléculaire et dont les propriétés diffèrent significativement de celles observées à plus grande échelle.
- Les **nanotechnologies** développent les techniques de fabrication, de manipulation et d'utilisation de structures à l'échelle nanométrique pour produire de nouveaux matériaux utilisables dans le monde réel.

Les nanosciences et les nanotechnologies recouvrent des domaines très variés (chimie, physique, biologie, médecine, électronique,...) et leurs activités concernent essentiellement la caractérisation, la fabrication de précision, la chimie et les matériaux.

Distinguons d'emblée les nanoparticules manufacturées, produites **intentionnellement** pour être utilisées dans un processus industriel, des nanoparticules générées de manière **involontaire** lors de processus industriels et domestiques ou des nanoparticules issues du milieu ambiant naturel, pour être complet.

Dans le cadre de ce travail, la comparaison se fera uniquement entre les nanoparticules (NP) manufacturées et les nanoparticules (PUF) produites involontairement lors des processus de combustion.

3.1 Propriétés des nanomatériaux

Toutes les catégories de matériaux que nous appellerons « massifs » sont concernées par les propriétés particulières des nanomatériaux : métaux, céramiques, carbones, polymères...

Les nanomatériaux, du fait de leur taille, présentent des caractéristiques différentes de l'échelle macroscopique. De fait, lorsque la taille d'une particule diminue, le nombre de particules par gramme augmente considérablement. Par exemple, si la taille d'une particule passe de 100 nm à 1 nm, le nombre de particules est multiplié par 1.000.000 ! De même, lorsque la taille d'une particule évolue de 100 à 1 nm, la surface particules/environnement est multipliée par 100, à quantité de matière équivalente, 1 gramme de matière présentant une densité de 10 g/cm³ (voir tableau 5).

Tableau 5

DIAMÈTRE (nm)	SURFACE (m ²) / G	PARTICULES / g
100	6	1,9 10 ¹⁴
80	8	3,8 10 ¹⁴
60	10	8,9 10 ¹⁴
40	15	3,0 10 ¹⁵
20	30	2,4 10 ¹⁶
10	60	1,9 10 ¹⁷
1	600	1,9 10 ²⁰

SURFACE = surface spécifique (m²/g de matière) ; **PARTICULES** = nombre de particules/g de matière

Surface spécifique et nombre de particules sont exprimés en fonction du diamètre des particules pour une densité de 10 g/cm³.

Source : Afsset-« Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement »-Juillet 2006

De plus, la diminution de la taille des particules entraîne une augmentation de la proportion d'atomes en surface. A titre d'exemple, une particule de 30 nm présente 5% de ses atomes en surface tandis qu'une particule de 3 nm, elle, présente 50 % de ses atomes en surface.

Ainsi, une masse de nanomatériaux sous forme de NP sera nettement plus réactive que cette même masse faite de particules de dimension supérieure. Les particules nanométriques permettent alors d'obtenir de nouveaux matériaux présentant des propriétés mécaniques, électriques, magnétiques, optiques et catalytiques particulières, ces propriétés différant des propriétés du même matériau de base mais à une échelle supérieure.

Cependant, les propriétés des NP peuvent être modifiées de manière importante par la tendance à l'agglomération et à la formation d'agrégats pouvant atteindre une taille micrométrique.

Pour rappel, l'*agglomérat* désigne en général un groupe de particules dont la cohésion est due aux forces de Van der Waals, aux forces électrostatiques ou aux forces développées par les tensions de surface.

L'*agrégat* désigne, lui, des particules plus fortement liées et difficilement séparables.

C'est pourquoi les nanomatériaux sont souvent stabilisés par l'utilisation de revêtements.

Principales propriétés des nanomatériaux

A. Propriétés mécaniques

L'effet de la nanostructure se traduit par un phénomène de **superplasticité**, avec par exemple, un allongement de l'ordre de 5000 % pour un matériau de cuivre nanocristallin obtenu par laminage à

froid. Les nanomatériaux permettent également d'améliorer la **résistance** des matériaux. Ces propriétés sont appliquées dans les domaines de l'outillage, de l'aéronautique, de la céramique, du plastique, etc.

B. Propriétés électriques

La conductivité électrique de matériaux isolants peut être radicalement modifiée par l'introduction de nanoparticules ou de nanotubes (nanostructures longilignes). Dans l'exemple ci-dessous, l'ajout de nanotubes de carbone de type monofeuillet dans une matrice d'alumine (Al_2O_3) mène à une modification de 13 ordres de grandeur de la valeur initiale de la conductivité électrique (tableau 6).

Tableau 6

MATÉRIAUX	TAILLE DU GRAIN (nm)	CONDUCTIV. ÉLECTR. (S/m)
Al_2O_3 pur	350	10^{-12}
5,7-vol % noir de carbone / Al_2O_3	200	15
5,7-vol % SWNTC / Al_2O_3	200	1050
10-vol % SWNTC / Al_2O_3	100	1510
15-vol % SWNTC / Al_2O_3	100	3345

CONDUCTIV. ELECTR. = Conductivité électrique

SWNTC = Nanotube de carbone monofeuillet

Source : Zhan G.D. et coll., *Applied Physics Letters* Volume 83(6) 1228-1230.

C. Propriétés optiques

Les propriétés optiques d'un matériau peuvent être améliorées grâce aux nanoparticules dont les dimensions sont inférieures aux longueurs d'onde de la lumière visible (380-780 nm). L'application de ces propriétés permet la fabrication d'écrans et de verres antireflets, par exemple.

D. Propriétés de transfert thermique

La conductivité thermique peut être modifiée par l'ajout de NP pour de faibles fractions volumiques.

Par exemple, l'ajout de NP de fer ou de cuivre, de l'ordre du dixième de % en fraction volumique, se manifeste par une augmentation de l'ordre de 10 % de la conductivité thermique des fluides caloporteurs auxquels on a ajouté ces particules.

E. Propriétés de barrière

Les propriétés de barrière vis-à-vis de l'eau et des gaz, dans les nanocomposites à matrice polymère, par exemple, augmentent avec l'incorporation d'argile, dont les lamelles de silicate sont imperméables à l'eau et aux gaz.

F. Propriétés ignifuges

L'introduction de lamelles d'argile de taille nanométrique dans une matrice polymère (nanocomposite silicate-polymère) améliore les propriétés de barrière et de résistance à la combustion en formant une nanostructure multicouche de silicate isolante, retardant ainsi la dégradation de la matrice polymère.

G. Propriétés magnétiques

La dimension des domaines cristallins a un effet très marqué sur le comportement magnétique des matériaux via la modification du champ coercitif. Dans le domaine du magnétisme, l'apport des nanomatériaux a permis de développer de nouvelles gammes de matériaux, à champ coercitif variable et de faire évoluer l'imagerie médicale de type RMN, par exemple.

H. Propriétés catalytiques

Les NP d'or illustrent la modification possible des propriétés catalytiques de NP manufacturées.

Il est bien établi que l'or massif n'a, au départ, aucune propriété catalytique particulière. Par contre, il a été démontré que les NP d'or possèdent des propriétés catalytiques pour l'oxydation du CO (Haruta et coll., 1993). De plus, l'étude de la cinétique de l'oxydation du CO a mis en évidence une modification de l'activité catalytique en fonction de clusters d'or de tailles différentes.

Conclusion

Les nanomatériaux permettent l'amélioration de nombreuses propriétés de la matière qui les constitue, grâce à leur taille nanométrique.

C'est pourquoi le domaine du champ d'application des nanomatériaux et des industries concernées est si vaste, ce qui explique les enjeux économiques considérables entraînant une compétition impitoyable au niveau mondial, particulièrement pour les Etats-Unis, le Japon et l'Europe.

3.2 Classification des nanomatériaux

Les nanomatériaux sont classés en quatre familles selon leurs formes d'utilisation.

A. Nanopoudres et poudres ultrafines

Certains auteurs désignent les nanopoudres sous le terme de « nanoparticules ». Dans ce cas-ci, *aucune des trois dimensions du nanomatériau n'est supérieure à 100 nm*.

Remarquons que, depuis des années déjà, de grands groupes industriels (Toshiba, Kodak...) produisent et/ou commercialisent des NP de type noir de carbone, silices, alumines ou dioxyde de titane, **couramment** utilisées pour diverses applications, comme les pigments pour peintures, les pneus, les crèmes solaires, etc.

Nanopoudres de catalyseurs

Ces NP ne nécessitent pas de structuration particulière, sont utilisées directement et se révèlent très efficaces.

De fait, plus une particule est petite, plus sa surface est grande par rapport à son volume, avec des interactions particule-environnement d'autant plus grandes. Les NP d'or constituent un bon exemple de catalyseur pour la réaction d'oxydation du CO (voir. chapitre 4.1) mais aussi pour d'autres réactions catalytiques comme la synthèse du méthanol (Sakurai et Haruta, 1996), la réduction des oxydes d'azote (Ueda et Haruta, 1999), l'oxydation du méthane (Grisel et coll., 2000), du propène (Hayashi et coll., 1998) ou des composés organiques volatils (Centeno et coll., 2002).

Nanocapsules

Ces nanostructures sont décrites comme des NP creuses dans lesquelles des substances peuvent être introduites : fragrances, enzymes, catalyseurs, huiles, matériel biologique, etc.

Les nanocapsules polymériques ne doivent pas être confondues avec les technologies de micro encapsulation utilisées depuis un certain nombre d'années.

Les domaines potentiels d'application des nanocapsules sont les suivants : administration de médicaments, agrochimie, traitement des eaux usées, textiles (additifs aromatiques), cosmétiques, etc.

Fullerènes

La découverte, en 1985, d'une forme de carbone pur a valu à ses auteurs (Kroto H., Smalley R. et Curl R.) le prix Nobel de Chimie.

Il existe plusieurs molécules de fullerène avec un nombre variable d'atomes de carbone. La forme la plus courante, parce que la plus facile et la moins coûteuse à produire, comprend 60 atomes de carbone (C_{60}), d'un diamètre d'environ 1 nm. Anti-oxydante, résistance physique, super conductivité, haute tolérance des systèmes biologiques figurent parmi les propriétés des fullerènes.

Citons quelques applications possibles dans le domaine des lubrifiants, catalyseurs, télécommunications, applications médicales ou encore stockage de l'hydrogène, etc.

B. Nanofils, nanotubes et tétrapodes

Nous abordons ici les nanomatériaux dont *une des dimensions est supérieure à 100 nm*.

Nanofils

Le terme désigne les nanostructures longilignes avec une section de un à quelques dizaines de nanomètres et une longueur de 500 à 10.000 nanomètres.

Les nanofils peuvent être utilisés pour la transmission de signaux électriques et optiques, dans le blindage antichocs et la production de matériaux de type biomimétiques. Ces matériaux biomimétiques permettent de développer des adhésifs sans colle et à repose multiple, ou permettent de reproduire l'« effet lotus » pour empêcher la fixation de dépôts sur certaines surfaces, à l'image de la « super hydrophobie » de la feuille de lotus sur laquelle rien n'adhère.

Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone (NTC) constituent un cas particulier de nanofils formés de un ou plusieurs tubes concentriques d'une longueur de 5 μm ou plus ! On distingue les nanotubes de carbone monofeuillets (SWCNT)¹⁰, d'un diamètre de 0,7 à 1,5 nm, des nanotubes multifeuillets (MWCNT)¹¹, de 2 à 50 nm.

Ces NTC présentent des propriétés particulièrement intéressantes dont flexibilité, résistance (100 fois plus que l'acier) et légèreté. Les NTC sont d'excellents conducteurs d'électricité et les meilleurs conducteurs thermiques connus. Ils sont également naturellement acceptés par le corps.

De nombreuses applications, actuelles ou en projet, existent dans le secteur des polymères et céramiques (résistance des céramiques à la fracture, par exemple), dans le secteur des textiles (textiles ultra-résistants), dans le secteur de l'énergie (stockage de l'hydrogène, par exemple), dans le secteur biomédical (muscles artificiels, par exemple).

Tétrapodes

Aujourd'hui, on connaît surtout les tétrapodes d'oxyde de zinc dont les propriétés physiques (optiques, notamment) sont particulières de même que les propriétés piézoélectriques, pyroélectriques et de semi-conduction.

Les applications visent à augmenter la résistance des composites ou à absorber les micro-ondes, par exemple.

¹⁰ SWCNT : Single-Wall Carbon NanoTubes

¹¹ MWCNT : Multi-Wall Carbon NanoTubes

C. Nanofilms

Les nanofilms, dont *deux des dimensions sont supérieures à 100 nm*, servent de revêtements de surface. Ces revêtements peuvent être constitués de nanocouches élémentaires ou de multi-nanocouches et procurer à la surface des propriétés mécaniques (dureté, par exemple), thermiques (isolation, par exemple), chimiques (résistance à la corrosion, par exemple), biologiques, électroniques, magnétiques, optiques ou encore des propriétés liées à l'hydrophobie ou à l'hydrophilie.

Les possibilités d'applications sont nombreuses : les fenêtres autonettoyantes grâce à un revêtement hydrophobe, des tuiles et peintures de façade empêchant le développement d'algues et de champignons (disponibles sur le marché), des outils de coupe résistants au frottement, des textiles aux propriétés « respirantes » et résistants à l'eau et aux taches, etc.

D. Nanocomposites

Les nanocomposites, de par leur structure intrinsèque (porosité, réseau nanocristallin, ...) disposent de propriétés physiques particulières (optiques, diélectriques, ...) et d'une grande surface d'échange.

Le terme « nanocomposite » a été défini de multiples façons. Cependant, ces définitions ont toujours en commun la taille nanométrique du ou des renforts dans la matrice et la taille caractéristique de 100 nm ou moins des mélanges multiphasiques constituant le composite¹².

Les nanocomposites seront classés selon la nature de la matrice incorporant les nanoparticules : matrice organique, matrice métallique, matrice polymère, matrice céramique. Les renforts contenus dans la matrice seront, eux, classés selon leur géométrie : nanoparticules ; nanotubes et nanofibres ; plaques, lamelles et feuillets.

Les productions de nanocomposites sont nombreuses parmi lesquelles :

- les fumées de silice, incorporées au béton pour améliorer fluidité et propriétés mécaniques,
- le noir de carbone, constituant des pneumatiques et des encres d'imprimantes,
- le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc mélangés aux crèmes solaires,
- les dendrimères (molécules sphériques de polymères formées par auto-assemblage) que l'on projette d'utiliser comme agent de décontamination de l'environnement, etc.

Il nous faut encore mentionner un dernier type de nanomatériaux : le nanofluide.

Le nanofluide est défini comme un fluide contenant une dispersion de NP sous forme de suspension ou de colloïde. Cette dispersion peut être utile pour le stockage et le transport, de manière à diminuer les dangers d'explosion au contact de l'atmosphère.

Le principe de nanodispersion est également utilisé dans le domaine des fluides abrasifs ou magnétiques et dans le domaine thermique. Aussi, l'ajout de nanoparticules (Fe, Cu, Al₂O₃) dans un fluide (voir propriétés de transfert thermique, chapitre 5.1) intéresse le secteur de l'énergie car la conductivité thermique du fluide sera modifiée.

Conclusion

En réalité, tous les secteurs industriels seront concernés, à court, moyen et long terme, par le développement des nanomatériaux, qui font et feront de plus en plus partie du quotidien des consommateurs potentiels que nous sommes, avec une production globale de plusieurs millions de tonnes par an et une croissance en volume de minimum 2,7 % (Metal Powder Report, 2005).

Certains chiffres donnent le vertige, comme ceux du marché des nanocomposites avec une production de 11.000 tonnes en 2003 et des prévisions de 500.000 tonnes en 2010 (Développement et Conseil, 2004).

¹² Etats-Unis Sciences Physiques n°11, mai 2004

La Commission européenne a estimé le revenu mondial, généré par les nanotechnologies et les nanomatériaux, à 40 milliards d'euros en 2001 et les experts prévoient un impact économique de 1.000 milliards d'euros par an, avant 2015, pour les nanotechnologies, avec des applications commerciales dans de nombreux secteurs industriels dont l'automobile, la chimie, le bâtiment, l'électronique, l'agro-alimentaire, la cosmétique, etc.

3.3 Méthodes de production des nanomatériaux

De nombreux procédés d'élaboration, parmi les procédés chimiques, physiques ou mécaniques, permettent la fabrication des nanomatériaux. Ces procédés doivent impérativement maîtriser plusieurs paramètres : la taille, la forme, la composition et le degré d'agglomération des particules pour les systèmes dispersés.

On distingue classiquement deux types d'approches : l'approche « **bottom up** » et l'approche « **top down** ».

La première approche vise la construction de structures atome par atome ou molécule par molécule et concerne les métaux, les céramiques, les semi-conducteurs, les polymères, les fullerènes et les nanotubes. Ensuite, ces structures seront utilisées telles que produites ou serviront d'éléments de base pour la réalisation d'architectures nanostructurées. Les architectures se forment en s'auto-organisant ou en subissant des opérations de transformation.

La deuxième approche vise la production de nanomatériaux à partir de fractionnements successifs d'un matériau microstructuré soumis à des sollicitations mécaniques « sévères ».

Lors de la fabrication des NP, la stabilisation en taille constitue une étape clé car, à cause de leur grande réactivité, les NP ont tendance à former des agglomérats ou des agrégats qui modifient radicalement les propriétés recherchées.

A la fin du processus de fabrication, la stabilisation peut s'opérer de différentes façons comme l'inclusion dans une matrice, la dispersion dans un liquide ou la formation d'une poudre nanostructurée.

Précisons que la très grande majorité des procédés de fabrication sont réalisés dans des systèmes clos. Par conséquent, un opérateur n'est exposé que s'il survient un événement accidentel ou une fuite. Bien que l'on manque d'études dans les secteurs concernés, on peut supposer que c'est durant les opérations de transfert, de conditionnement et d'utilisation (dans l'industrie client ou par le consommateur !) que l'exposition serait la plus probable.

4. Approche physiologique du comportement des particules de taille nanométrique

Ce chapitre rassemble les connaissances actuelles concernant le comportement commun aux particules de taille nanométrique, quelle que soit leur source, industrielle pour les NP manufacturées, ou due aux processus de combustion pour les PUF.

4.1 Exposition

Cinquante tonnes de PUF produites chaque année, par des processus anthropogéniques, s'additionnent aux NP manufacturées, de plus en plus nombreuses, pour constituer des quantités énormes de surface réactive auxquelles nous sommes soumis aujourd'hui et encore bien davantage demain !

Malgré des normes et des réglementations visant à réduire les émissions de particules des industries et des véhicules motorisés, la croissance économique à tout prix des pays émergents, par exemple, de même que l'évolution continue du transport routier et du marché automobile au niveau mondial, expliquent l'exposition généralisée de la population aux aérosols de particules, y compris de PUF.

Concernant les nanomatériaux, les prévisions de production sont telles que, l'exposition des travailleurs et de la population à ces nanomatériaux, de même que la pénétration de ceux-ci dans l'environnement semblent inévitables durant leurs cycles de vie (production, utilisation ou élimination). En effet, si aujourd'hui la production de nanomatériaux manufacturés est faible, il n'en sera pas de même demain car la croissance des investissements en R&D à l'échelle mondiale entraînera une production nettement plus importante dans les années qui viennent.

A titre d'exemple, la production de nanomatériaux de type céramiques, catalyseurs ou composites, est de l'ordre de 10 tonnes par an et devrait passer à 1.000 tonnes par an en 2010 et jusqu'à 100.000 tonnes par an en 2020 (London, The Royal Society, 2004).

Précisons que ce chapitre étant consacré aux impacts des PUF et des NP sur la santé, la discussion portera aussi sur les agglomérats et les agrégats de particules, car même si leur taille dépasse 100 nm, ils sont susceptibles de se séparer dans certaines conditions pour former à nouveau des particules libres et de taille nanométrique.

4.1.1 Comportement des particules de taille nanométrique

Comme vu précédemment (voir chapitre 3), les aérosols de particules ultrafines ou nanométriques ont un comportement très différent de celui des aérosols micrométriques.

Depuis leur émission jusqu'à leur éventuelle inhalation, plusieurs mécanismes vont déterminer le comportement des PUF et des NP mises en suspension dans l'air, mais aussi les modes et les niveaux d'exposition des personnes. Ces mécanismes sont la diffusion, la coagulation, le dépôt et la resuspension.

1. Diffusion

En suspension dans l'air, les particules de l'aérosol sont soumises aux forces inertielles, aux forces gravitationnelles et aux forces de diffusion.

Les forces de diffusion sont prépondérantes et plus les particules sont petites, plus la vitesse de diffusion est importante pour se rapprocher du comportement des gaz. Aussi, en cas de fuite dans un système clos de production par exemple, les particules de taille nanométrique auront une tendance plus marquée à s'échapper.

2. Coagulation et agglomération

Dès son émission dans l'ambiance de travail, le devenir de l'aérosol de NP manufacturées sera pratiquement le même que celui d'un aérosol de PUF libéré dans l'air.

Ces particules sont soumises à des réactions de coagulation (du fait de la diffusion et de ses mouvements browniens) qui forment des agrégats ou des agglomérats, et donc des particules plus grosses et moins nombreuses, qui modifient les caractéristiques granulométriques de l'aérosol qui était constitué de particules isolées.

Après coagulation, les particules présenteront un diamètre aérodynamique plus grand (jusqu'à plusieurs centaines de microns), diamètre qui influencera le mode de dépôt dans les voies respiratoires et rendra les particules moins mobiles.

3. Dépôt

Les particules en suspension dans l'air peuvent sédimenter, sous l'effet de la gravitation.

La vitesse de sédimentation d'une particule étant proportionnelle à son diamètre aérodynamique, les particules de taille nanométrique restent longtemps en suspension dans l'air, ce qui leur permet de persister plus longtemps dans l'air ambiant et de contaminer des surfaces plus étendues.

4. Mise et remise en suspension

La mise en suspension d'aérosols dans l'air a été très bien étudiée dans l'atmosphère de travail, à partir de poudres provenant de matériaux pulvérulents.

Le principe peut s'appliquer à toutes les atmosphères, pour les PUF issues des phénomènes de combustion, de même que pour les NP manufacturées.

Dans le cas des nanomatériaux, après leur synthèse, ceux-ci sont souvent conditionnés sous formes de poudres en vrac et peuvent être remis en suspension lors de manipulations, de conditionnements ou de renversements accidentels, sous forme d'agglomérats. Ces agglomérats peuvent parfois, néanmoins, conserver une taille nanométrique. La tendance des particules à se remettre en suspension (en anglais, « dustiness ») dépend de nombreux paramètres dont la forme, la charge électrostatique, l'état de surface, le degré d'hygrométrie, etc.

La plupart du temps, cette tendance à former des agglomérats constitue un inconvénient pour les applications industrielles. C'est pourquoi, les procédés de synthèse peuvent comporter un traitement de surface qui prévient ce phénomène, à la différence des PUF de sources anthropogéniques, libérées dans l'air ambiant à l'état « brut ».

4.1.2 Exposition des travailleurs

A la différence des PUF de combustion, qui concernent une grande partie de la population et relativement peu les travailleurs, les NP industrielles concernent encore peu la population générale mais davantage les travailleurs, à ce stade-ci du développement des NP.

Cependant, les données recueillies à partir des travailleurs, peuvent aider à la compréhension du comportement des PUF de combustion dans la population générale.

Actuellement, l'exposition des travailleurs se fait surtout dans les laboratoires de recherche, les industries de fabrication et les industries qui incorporent des nanomatériaux dans la fabrication d'autres produits. Sont particulièrement concernées, l'industrie pharmaceutique et les industries fabriquant du noir de carbone, des ciments, des peintures, des pigments et des colorants.

Aujourd'hui, peu de types de NP sont en phase de production industrielle c'est-à-dire supérieure à 10 tonnes par an. Seuls le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc, l'oxyde de cérium, l'alumine, la silice, le noir de carbone et l'oxyde de fer sont produits en quantités industrielles.

Mais pour les prochaines années, des développements industriels importants sont prévus, par exemple pour la production de NTC aux Etats-Unis et au Japon mais aussi en Chine et en Corée. C'est ainsi qu'une étude prospective¹³ évaluée à deux millions, le nombre d'employés directement concernés au niveau mondial d'ici 2010.

¹³ DiGITIP-Etude prospective sur les nanomatériaux, mai 2004

1. *Potentiel d'exposition aux NP*

Deux facteurs déterminent le risque sanitaire lié à l'exposition à des produits (potentiellement) dangereux : la toxicité intrinsèque du produit et le potentiel d'exposition des personnes.

Pour évaluer le potentiel d'exposition, trois facteurs doivent être identifiés :

- la probabilité de l'exposition
- la voie d'exposition
- l'importance de l'exposition

L'évaluation de l'exposition requiert une analyse précise de l'ensemble des processus et des activités de travail en analysant, pour chaque stade, les risques d'exposition et les voies d'exposition (respiratoire, digestive ou cutanée).

Or, cette analyse systématique n'existe ni pour la production des NP et leur utilisation dans d'autres procédés de production, ni pour les traitements « post production » qui visent à maintenir les NP dispersées ou à modifier la surface des NP produites.

En principe, les voies cutanée et digestive restent des *voies d'exposition* mineures tandis que la voie respiratoire constitue la voie d'exposition la plus importante, par inhalation de NP dispersées dans les ambiances de travail.

Dans les entreprises industrielles, les modes de synthèse des NP ou nanomatériaux se font généralement en **système clos** pour réduire autant que possible la *probabilité d'exposition* des travailleurs.

Les contaminations seront dues à des circonstances accidentelles, à des fuites dans les équipements ou à une filtration défectueuse sur les extractions.

Ce sont les phases de récupération des produits, les travaux de nettoyage et d'entretien des équipements qui constituent un risque d'exposition des travailleurs et de contamination des surfaces de travail. Le risque d'exposition existe aussi lors des opérations d'emballage, de conditionnement et de stockage.

L'*importance de l'exposition* doit être quantifiée par des mesures d'aérosols dans les ambiances de travail. En réalité, très peu de données sont disponibles qui portent sur l'évaluation des expositions aux NP dans les secteurs d'activités « conventionnelles », dans les entreprises nouvelles du secteur des nanomatériaux et dans les laboratoires de recherche.

Mesurer l'exposition réelle aux NP dans une ambiance de travail s'avère impossible aujourd'hui d'une part, parce qu'il n'existe pas d'appareil individuel permettant la mesure spécifique des concentrations des particules inférieures à 100 nm, et d'autre part, parce que les appareils utilisés actuellement ne permettent pas de distinguer les NP émises par les procédés industriels, des NP déjà présentes dans l'ambiance de travail et qui constituent un « bruit de fond ».

2. *Évaluation des expositions et du risque sanitaire*

Le risque toxique se définit par une toxicité associée à une exposition.

Pour évaluer le risque, il faut d'abord identifier le produit, ou matériau, et sa *toxicité* en terme de nature chimique mais aussi de dimension des particules, de forme, de caractéristiques de surface, de présence d'impuretés ou de traitements de surface post synthèse.

Pour l'évaluation quantitative de l'*exposition* aux NP, une question reste essentielle: « quel paramètre est le plus pertinent ? ». La concentration en nombre ou en masse, la surface totale, la distribution granulométrique, la surface réactive, l'état d'agglomération ou non, la composition chimique?

La concentration en nombre et la surface spécifique des NP seraient des paramètres mieux adaptés pour évaluer l'exposition, et donc le risque, par rapport à la concentration massique utilisée dans l'approche conventionnelle, dans la mesure où cette concentration massique est extrêmement faible pour les NP, et par conséquent difficilement mesurable.

Aujourd'hui, il est impossible de poser des bases claires pour une stratégie générale de caractérisation des matériaux et d'évaluation des expositions.

En effet, à l'heure actuelle, il n'existe pas de technique qui permette de mesurer tous les paramètres pertinents. De plus, ces techniques nécessitent des appareils de laboratoires coûteux et difficiles à mettre en œuvre et ne peuvent donc pas être utilisées en pratique de routine afin de surveiller les ambiances de travail.

Ces questions, pourtant essentielles pour évaluer les risques sanitaires dans le milieu du travail (et au-delà !), semblent susciter peu d'intérêt de par le monde.

Les principales équipes se trouvent aux Etats-Unis, où le NIOSH¹⁴ a démarré un programme de recherche, et en Europe où le programme NANOSAFE 2 est développé sous l'impulsion du sixième Programme cadre de recherche et de développement technologique (PCRDT).

Nous reprendrons ici la conclusion de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (Afsset)¹⁵ : « *Il existe un besoin important de développement des instrumentations spécifiques, robustes et faciles à mettre en œuvre, ainsi que des stratégies de mesure adaptées, validées et standardisées, pour que des évaluations quantitatives d'exposition puissent être conduites dans les laboratoires et les entreprises concernées. D'autre part, la connaissance de la toxicité des matériaux et l'établissement de relations dose/effets sont un préalable indispensable à une évaluation quantitative du risque sanitaire relatif à l'exposition aux nanomatériaux.* »

Il est donc impératif de rassembler les données concernant les paramètres qui vont modifier la toxicité des matériaux. Il est tout aussi impératif de concevoir des appareils faciles à utiliser et capables d'effectuer en temps réel des mesures de longue durée ainsi que des appareils individuels portables.

4.1.3 Exposition de la population

A l'inverse du chapitre précédent, «Exposition des travailleurs», l'exposition aux PUF de combustion concerne une grande partie de la population générale, mais relativement peu les travailleurs, en dehors de ceux qui sont soumis aux fumées de soudage ou de diesel (soudeurs, mécaniciens, personnel des péages et des parkings, ...).

L'exposition de la population aux particules est décrite par G. Collado dans le chapitre 3 de son mémoire «Analyse de données européennes sur la matière particulaire. Nécessité de révision des normes.». Cependant, les données recueillies concernent les PM₁₀ et les PM_{2,5} et non les PUF. Aussi, à l'avenir, les informations obtenues, à partir de l'exposition de la population aux NP manufacturées, pourraient être utiles à la connaissance de l'exposition de cette même population aux PUF.

Comme pour l'évaluation des risques dans la population des travailleurs, l'évaluation des risques sanitaires liés aux nanomatériaux, pour la population générale, est faite par l'identification des *dangers* associés et par la caractérisation des *expositions* humaines.

Malheureusement, les données relatives à la toxicité et à l'exposition de la population aux NP sont très peu nombreuses.

¹⁴ NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health.

¹⁵ Afsset-Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement-Juillet 2006

Aussi, tous les rapports publiés sur le sujet demandent-ils le développement de programmes de recherche pour l'identification et l'analyse des expositions de la population, comme le rapport du SCENHIR¹⁶ en 2005, par exemple.

1. Sources d'exposition

Face aux perspectives de croissance en termes de production et d'utilisation des nanomatériaux, les expositions humaines ne cesseront de croître.

Parmi les produits dont l'élaboration utilise les nanotechnologies, ou qui incorporent des nanomatériaux, les consommateurs achètent principalement des vêtements, des accessoires sportifs, des cosmétiques, des produits d'hygiène corporelle mais aussi des jouets, des appareils électroniques et informatiques, des emballages alimentaires, des matériaux de construction et d'ameublement¹⁷. Carbone (nanotubes et fullerènes), argent, silicium, oxyde de titane, oxyde de zinc et oxyde de cérium sont les nanocomposants les plus utilisés dans ces produits de consommation.

Les utilisations dans les secteurs des cosmétiques, des équipements sportifs et des textiles concernent un nombre important d'industries et une proportion croissante de la population qui « consomme » ces produits.

Aussi, l'évaluation des expositions humaines passe par la connaissance précise de la composition des produits mais aussi par la compréhension du comportement de la matrice contenant les nanomatériaux.

Les données, trop peu nombreuses, sur les sources d'exposition de la population montrent néanmoins l'importance de recenser les usages normaux et les possibilités d'usure et de dégradation des nanomatériaux lors de leur utilisation ou de leur élimination, générant l'exposition des populations.

2. Voies d'exposition

Deux types d'exposition sont possibles :

- expositions directes concernant les nanomatériaux dans les produits d'hygiène corporelle, les cosmétiques, les médicaments, les textiles, les prothèses médicales, etc.
- expositions indirectes lorsque des NP se retrouvent dans l'environnement suite à l'usure, à la dégradation ou à la fin de vie des nanomatériaux présents dans les pneumatiques, les encres, les appareils électroniques, les textiles ou en dépôt sur les vitrages, etc.

Nos connaissances actuelles permettent de dresser l'inventaire des **voies d'exposition** possibles mais sans fournir d'éléments quantitatifs quant à ces expositions :

▪ **Inhalation**

C'est la voie citée en premier lieu pour évoquer l'exposition humaine. Comme pour les travailleurs, les données d'exposition de la population sont très rares car elles nécessitent de nouvelles approches métrologiques.

▪ **Voie cutanée.**

Les NP dans des cosmétiques commercialisés sont aujourd'hui une réalité. Même si cette voie semble minoritaire par rapport à l'inhalation ou à l'ingestion, compte tenu du faible diamètre des NP, leur pénétration cutanée pourrait être facilitée. Cependant peu de travaux sont disponibles et ils apparaissent parfois contradictoires.

¹⁶ SCENHIR :Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks, comité scientifique indépendant qui informe la Commission Européenne

¹⁷ L'inventaire des produits commerciaux dérivés des nanotechnologies est consultable sur www.nanotechproject.org

▪ Ingestion

L'usage des nanomatériaux envisagés pour la dépollution des sols et des eaux pourrait, à l'avenir, provoquer des expositions via les aliments et l'eau ainsi que des transferts dans la chaîne alimentaire. De même, l'usage des nanomatériaux comme additifs alimentaires ou dans les prothèses dentaires pourrait entraîner une ingestion de NP.

▪ Voie parentérale.

De nombreux usages thérapeutiques et diagnostiques sont attendus pour les nanomatériaux. C'est pourquoi, les expositions par voie intraveineuse ou intramusculaire seront à considérer.

Le **tableau 7**, ci-dessous, donne un aperçu des sources et des voies d'exposition possibles pour la population.

Type de produit	Emission ou source d'exposition	Population exposée	Voie d'exposition potentielle
Crème solaire contenant des matériaux à l'échelle nanométrique	Application de produit par le consommateur sur la peau	Consommateur	Cutanée
	Emission par le consommateur (par exemple nettoyage avec du savon et de l'eau) vers les réserves d'eau	Population générale	Ingestion
	Destruction des tubes de crème solaire (avec un résidu de crème solaire) après utilisation (dans des centres d'enfouissement de déchets ou par incinération)	Population générale	Ingestion ou inhalation
Catalyseurs métalliques dans l'essence pour réduire les gaz d'échappement des véhicules	Emission des gaz d'échappement des véhicules dans l'air (puis déposition sur la surface de l'eau)	Population générale	Inhalation ou ingestion

* Les catalyseurs métalliques ne sont pas utilisés actuellement dans l'essence aux USA.

Exemples de sources potentielles d'exposition pour la population générale et/ou les consommateurs pour plusieurs types de produits (U.S-EPA, 2005)

3. Quantification de l'exposition

Comme évoqué plus haut, la métrologie des expositions spécifiques aux NP reste à développer si on veut pouvoir prélever des échantillons et évaluer en temps réel des caractéristiques comme le nombre et la surface des particules de taille nanométrique.

Ces développements sont indispensables pour caractériser les risques résultants des expositions à ce type de particules.

Le biomonitoring, suggéré par Oberdörster, pour la caractérisation des expositions, représente une piste identifiée par la Commission Européenne et par l'US-EPA¹⁸ pour pouvoir s'affranchir des contraintes métrologiques et englober toutes les expositions de la population.

L'inventaire complet des nanomatériaux disponibles sur le marché et l'étude de leur devenir dans l'environnement et dans le corps humain restent néanmoins une étape indispensable avant toute réalisation d'un biomonitoring.

On retiendra qu'il existe très peu de données sur les expositions potentielles de la population et aucune sur les risques sanitaires qui y seraient liés, comme pour les PUF.

¹⁸ US-EPA :

Pour permettre l'évaluation des expositions, il est donc impératif d'inventorier les différentes sources et voies d'exposition de la population et d'identifier les paramètres caractérisant le mieux les expositions aux NP.

4.2 Distribution

4.2.1 L'appareil respiratoire

L'essentiel des recherches in vivo concernant la toxicité des NP a été réalisé sur le système respiratoire de mammifères, par analogie avec les recherches, entamées dans les années '90, au sujet des PUF atmosphériques et de leurs impacts sur la santé via le système respiratoire et uniquement via celui-ci.

Le chapitre « appareil respiratoire » sera commun aux deux types de particules.

Dans le cas des NP manufacturées, les autres voies d'entrée (cutanée et gastro-intestinale) doivent être envisagées.

1. Déposition des particules

Les particules se déposent dans les différentes régions du système respiratoire selon cinq mécanismes :

- le mécanisme de **diffusion** détermine essentiellement le dépôt des particules de taille nanométrique, mécanisme lié au mouvement aléatoire (ou brownien) des particules.
- les mécanismes de **sédimentation**, d'**impaction** inertielle et d'**interception** concernent surtout les particules fines
- l'**attraction électrostatique** s'applique à toutes les particules chargées.

On observe des différences importantes dans les sites de déposition en fonction du diamètre des particules inhalées. Pour les particules de taille nanométrique (1 nm-100 nm), le système respiratoire est divisé en trois régions, nasopharyngée, trachéobronchique et alvéolaire.

Pour ces particules, la figure 2 montre que :

- 90% des particules de 1 nm se déposent dans la région nasopharyngée, 10% dans la région trachéobronchique et pratiquement aucune dans les alvéoles.
- les particules de 5 nm se déposent dans chacune des trois régions à raison de 30% environ
- 50% des particules de 20 nm se retrouvent dans la région alvéolaire.

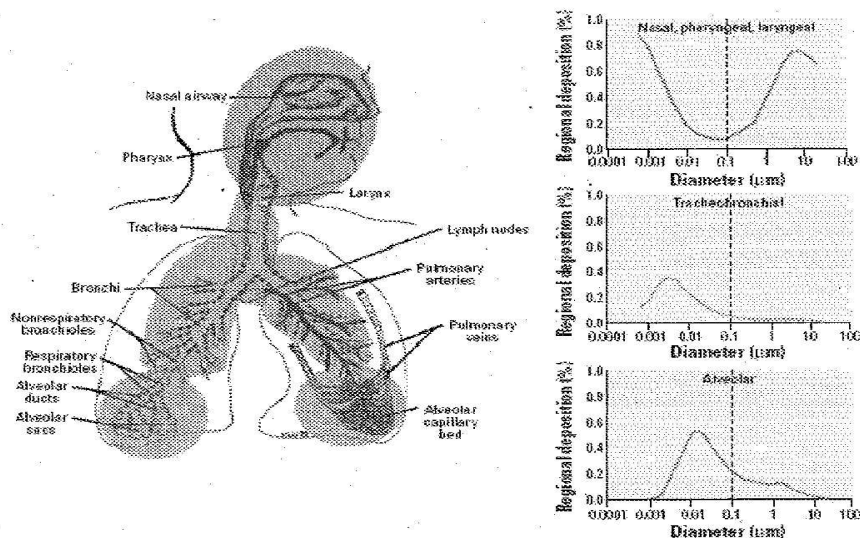


Figure 2

Sites de déposition dans l'appareil respiratoire en fonction de la taille des particules nanométriques (International Commission on Radiological Protection, ICRP, 1995).

Les différences dans les lieux de déposition, en fonction de la taille des particules nanométriques, pourraient avoir des conséquences sur leurs effets potentiels dans le système respiratoire, mais aussi sur leur passage vers les organes extra-pulmonaires.

2. Devenir des particules dans le système respiratoire

Dans les voies aériennes, les particules vont d'abord rencontrer une couche protectrice de mucus et de surfactant tapissant l'épithélium respiratoire.

Il faut distinguer ici les particules solubles des particules insolubles ou peu solubles :

- Les particules solubles seront éliminées par **dissolution**, ce processus d'élimination chimique se produit dans les trois régions du tractus respiratoire.
- Les particules insolubles ou peu solubles sont éliminées en 1 à 2 jours par l'action des **cellules ciliées** assurant une élimination physique.

Dans la région alvéolaire, les particules entrent directement en contact avec l'épithélium. Dans cette région, la **phagocytose** par les macrophages alvéolaires constitue le principal mécanisme d'élimination des particules insolubles ou peu solubles et se révèle efficace dans les 6 à 12 heures.

Après avoir phagocyté les particules, les macrophages effectuent un déplacement très lent vers « l'escalator mucociliaire », de l'ordre de 70 jours chez le rat et de 700 jours chez l'homme.

Cependant, des études chez le rat ont montré que les particules de taille nanométrique sont moins éliminées par les macrophages que les particules de taille micrométrique (Oberdörster et coll., 2000) et peuvent rester pendant des mois, voire des années, dans les cellules épithéliales ou l'interstitium !

La présence de ces particules non solubles peut provoquer des réactions pro-inflammatoires des cellules épithéliales ou interstitielles.

Ce mécanisme de dissémination dans l'interstitium, après passage de l'épithélium bronchique et alvéolaire, est appelé **translocation épithéliale**.

Kreyling et coll. (2002) constatent que la translocation est plus marquée chez les animaux de grande taille (dont les singes) que de petite taille (rongeurs) ce qui laisse penser que l'homme pourrait être également concerné par le phénomène de translocation épithéliale.

3. Devenir des particules au-delà du système respiratoire

Les particules situées dans l'interstitium pulmonaire peuvent passer dans la circulation sanguine. On parle de **translocation circulatoire**.

Les caractéristiques physico-chimiques des particules, et leur taille en particulier, vont moduler leur passage à travers les cellules épithéliales et endothéliales par transcytose.

Si la translocation circulatoire est incontestable chez les rongeurs (Nemmar et coll., 2001 ; Oberdörster et coll., 2005), certains résultats sont apparus contradictoires chez l'homme (Nemmar et coll., 2002a ; Beckett et coll., 2005).

Les travaux d'A. Nemmar semblent prouver la réalité de cette translocation chez l'homme dans une étude où un signal radioactif apparaît très rapidement dans le sang après que des volontaires aient inhalé des particules de carbone de 20 nm marquées au Tc99 (voir le chapitre 5.2.2).

L'importance du processus pourrait varier avec les nombreuses propriétés physico-chimiques des NP et PUF, et expliquer des résultats très variables (Kreyling et coll., 2006).

Après leur translocation dans la circulation, les particules nanométriques peuvent être distribuées dans tout l'organisme, vers le foie, et ensuite la rate, le cœur ou les reins.

4. Translocation axonale

Il existe encore une forme très particulière de translocation à partir de l'appareil respiratoire. Il s'agit de la **translocation axonale** qui se fait par les nerfs sensitifs de la muqueuse olfactive via les axones des nerfs olfactif et trigéminal jusqu'aux structures du système nerveux central (SNC).

Cette translocation axonale, spécifique aux particules de taille nanométrique, fut décrite il y a plus de 60 ans déjà par Home et Bodian, dans des études sur le virus de la « polio », instillé par voie nasale à des singes.

Leurs études ont montré que les nerfs et les bulbes olfactifs constituent une voie d'entrée vers le SNC pour les particules de virus, de taille nanoparticulaire, instillées par voie intranasale, et que le transport neuronal était rendu possible par la proximité de la muqueuse olfactive et du bulbe olfactif.

Plus récemment, une série d'études indique que la translocation axonale s'avère également opérationnelle pour les particules, de taille nanométrique, inhalées.

Une des études, réalisée par Oberdörster en 2004, montre une augmentation significative de ^{13}C dans le bulbe olfactif du rat dès le premier jour d'inhalation du ^{13}C sous forme de PUF.

L'ensemble des études confirme que le trajet du nerf optique chez l'homme peut servir de voie d'entrée vers le SNC, aux NP inhalées dans l'environnement ou dans une ambiance de travail. Ceci n'étonnera pas les virologues qui ont étudié, chez l'homme, les déplacements des virus de la méningite ou de l'herpès le long des axones de certains nerfs.

Remarquons que la taille mais aussi des caractéristiques de surface permettront à certaines NP inhalées, mais pas à toutes, d'emprunter le trajet des neurones.

4.2.2 L'appareil digestif

Les NP peuvent être ingérées **directement**, à condition que celles-ci soient contenues dans l'eau, la nourriture, des médicaments ou des vecteurs de médicaments ou encore des cosmétiques (rouges à lèvres...).

Une étude sur les particules fines et ultrafines dans la nourriture, réalisée dans le cadre de recherches sur la maladie de Crohn, estime que 10^{12} à 10^{14} nanoparticules et microparticules, principalement des silicates et du dioxyde de titane, sont ingérées par personne et par jour en Occident (Lomer et coll., 2002).

Les particules de taille nanométrique, inhalées et éliminées des voies aériennes par le mouvement mucociliaire, sont dégluties, accédant ainsi **indirectement** au système gastro-intestinal.

Un petit nombre d'études a été réalisé sur le devenir des NP dans le tractus gastro-intestinal avec des conclusions variables.

Certaines études montrent une élimination rapide des NP, pour l'essentiel dans les fèces, le reste dans l'urine, indiquant, pour une partie au moins, un passage dans le sang.

D'autres études montrent une translocation intestinale avec passage des NP dans le système sanguin ou lymphatique et distribution au foie et autres organes.

Les différences de résultats sont dues à la fois aux caractéristiques de surface et aux variations de taille des particules.

Les résultats disponibles ne permettent pas de conclure de façon générale.

4.2.3 La surface cutanée

La peau représente une voie d'entrée potentiellement importante pour les NP.

En effet, si l'épiderme constitue une surface protectrice efficace, une lésion au niveau de celle-ci permet l'entrée de particules dont la taille va jusqu'à plusieurs microns. De même, une peau intacte mais soumise à des mouvements répétés de flexion, par exemple,

rendra plus facile la pénétration de particules fluorescentes (1 µm) dans le derme par rapport à une peau maintenue immobile (Tinkle et coll., 2003).

Les NP, une fois dans le derme, sont reprises par le système lymphatique jusqu'aux nodules lymphatiques régionaux pour arriver dans la circulation sanguine (Corachan et coll., 1988 ; Oberdörster et coll., 1988 ; Kim et coll., 2004).

Par le passé, le seul processus de pénétration connu au niveau cutané était celui de la diffusion à travers les couches lipidiques du stratum cornéum, avec des liposomes jouant le rôle de transporteurs pour les traitements topiques.

Ensuite, plusieurs études ont suggéré un rôle pour les follicules pileux dans la pénétration percutanée. Des expériences, destinées à tester des produits dermatologiques, ont montré que les particules solides, en fonction de leur taille (de moins d'1µm à 10µm), se situaient soit uniquement à la surface de la couche cornée, soit uniquement dans les orifices des follicules pileux, soit et en surface et dans les follicules (Schaefer H et Lademann J, 2001).

Par la suite, d'autres études chez l'homme, avec application de différentes préparations contenant des NP de dioxyde de titane (Pflucker et coll. 2001), ou chez le porc avec application de NP d'oxyde de zinc (Cappel MJ et Kreuter J, 1991), ont montré (par fluorescence aux RX) que les particules restent en surface du stratum cornéum et que les particules dans les orifices des follicules ne pénètrent pas la peau.

Conclusion : dans l'état actuel de nos connaissances, il n'existe pas de pénétration percutanée par les NP, sur une peau saine.

5. Toxicologie des PUF et des NP manufacturées

Les connaissances en matière de toxicologie pour une substance donnée requièrent généralement, d'une part, des études réalisées dans les situations d'exposition, à savoir des études épidémiologiques et, d'autre part, des études expérimentales, *in vivo* et *in vitro*. Ce chapitre est principalement consacré aux études expérimentales *in vivo*.

5.1 Introduction

Dans le milieu du travail, les maladies liées aux poussières fines sont connues, parfois depuis des décennies : silicose, amiantose, béryllose, asthme professionnel etc.

Au niveau pulmonaire, la toxicité des particules semble liée au stress oxydatif, essentiellement causé par la très haute surface spécifique des poussières déposées, provoquant une activation des cellules épithéliales.

A la lumière de ces connaissances, l'étude de la fraction fine des particules *dans l'air ambiant* a permis de réaliser des études épidémiologiques attestant les impacts respiratoires et cardiovasculaires pour une partie importante de la population, particulièrement pour les catégories de population plus fragiles, avec une relation entre le niveau de pollution de l'air en particules et le niveau de morbidité et de mortalité.

Ces **études épidémiologiques** ont fait l'objet de beaucoup d'attention de la part de G.Collado dans son mémoire intitulé « Analyse de données européennes sur la matière particulaire. Nécessité de révision des normes. », et plus particulièrement le point 3.1.4. « Etudes épidémiologiques ». Quant à nous, nous nous centrerons essentiellement sur les études expérimentales *in vivo*, réalisées en laboratoire.

Des **études réalisées sur des volontaires**, pour étudier la déposition de la fraction fine des particules et des *PUF, produites en laboratoire* cette fois, confirment les effets de ces particules sur la santé et leurs impacts sur le système respiratoire (Brown et coll., 2002 ; Pekkanen et coll., 2002). Ces études concluent que la déposition des PUF, chez des sujets asthmatiques ou atteints d'une maladie pulmonaire chronique, est plus élevée que chez les sujets sains. Elles indiquent aussi que les effets des particules ne concernent pas uniquement le système respiratoire mais également le système cardiovasculaire avec, par exemple, des altérations du rythme cardiaque (Gold et coll., 2000), voire un infarctus du myocarde.

Les **études sur l'animal** (essentiellement des rongeurs) montrent, d'une part, des inflammations pulmonaires significatives avec changement histopathologique et d'autre part, la présence de particules dans des organes extra-pulmonaires, par **translocation**.

La translocation, dans la circulation sanguine, de PUF inhalées semble promouvoir thrombose et coagulation sanguine accrue (Kreyling et coll., 2002). Si le phénomène est démontré chez le hamster (Nemmar et coll., 2002b), la situation chez l'homme est moins claire.

L'état des connaissances des effets des PUF issues de la pollution atmosphérique fait craindre des effets néfastes sur la santé à cause des NP manufacturées dans ce cas-ci.

De fait, les PUF, dont les propriétés granulométriques sont semblables aux NP, démontrent des effets toxiques sur de nombreux organes, même si ces particules sont absorbées uniquement par la voie pulmonaire.

Tous les articles et les rapports consultés à ce jour s'accordent sur un point : trop peu de données sont actuellement disponibles qui examinent spécifiquement l'aspect « toxicité » des NP manufacturées. Ces données toxicologiques restent insuffisantes à cause, notamment, du faible nombre d'études publiées, de la courte période d'exposition, du souci de discrétion des entreprises concernées, du nombre élevé de produits dont chacun peut démontrer des caractéristiques et des propriétés uniques, etc.

Aujourd'hui, nous devons constater que l'on dispose de données toxicologiques expérimentales pour un *très petit nombre* de NP, comme le noir de carbone ou le dioxyde de titane, produits depuis des décennies par l'industrie chimique, à raison de plusieurs tonnes par an. Ces NP ont longtemps été considérées comme « inertes » jusqu'à ce qu'on observe inflammation et tumeurs pulmonaires chez des rats après une exposition prolongée.

Pour résumer les effets sanitaires des PUF atmosphériques et des NP manufacturées, nous retiendrons que « *les poussières ultrafines, de mêmes dimensions que les nanoparticules, pénètrent principalement dans l'organisme via l'inhalation et se déposent dans les poumons, une partie pouvant se distribuer directement au cerveau via les nerfs olfactifs. Les poumons ne réussissent pas nécessairement à éliminer ces particules indésirables qui causent alors de l'inflammation pulmonaire qui peut conduire au développement de certaines maladies pulmonaires spécifiques à la nature des poussières les ayant causées. De plus, ces très fines poussières peuvent franchir les différentes barrières de protection pulmonaire, atteindre le système sanguin et être distribuées dans toutes les parties du corps où elles pourront causer des dommages de différentes natures* »¹⁹.

La figure 3 illustre les effets sur l'organisme de l'inhalation de poussières ultrafines

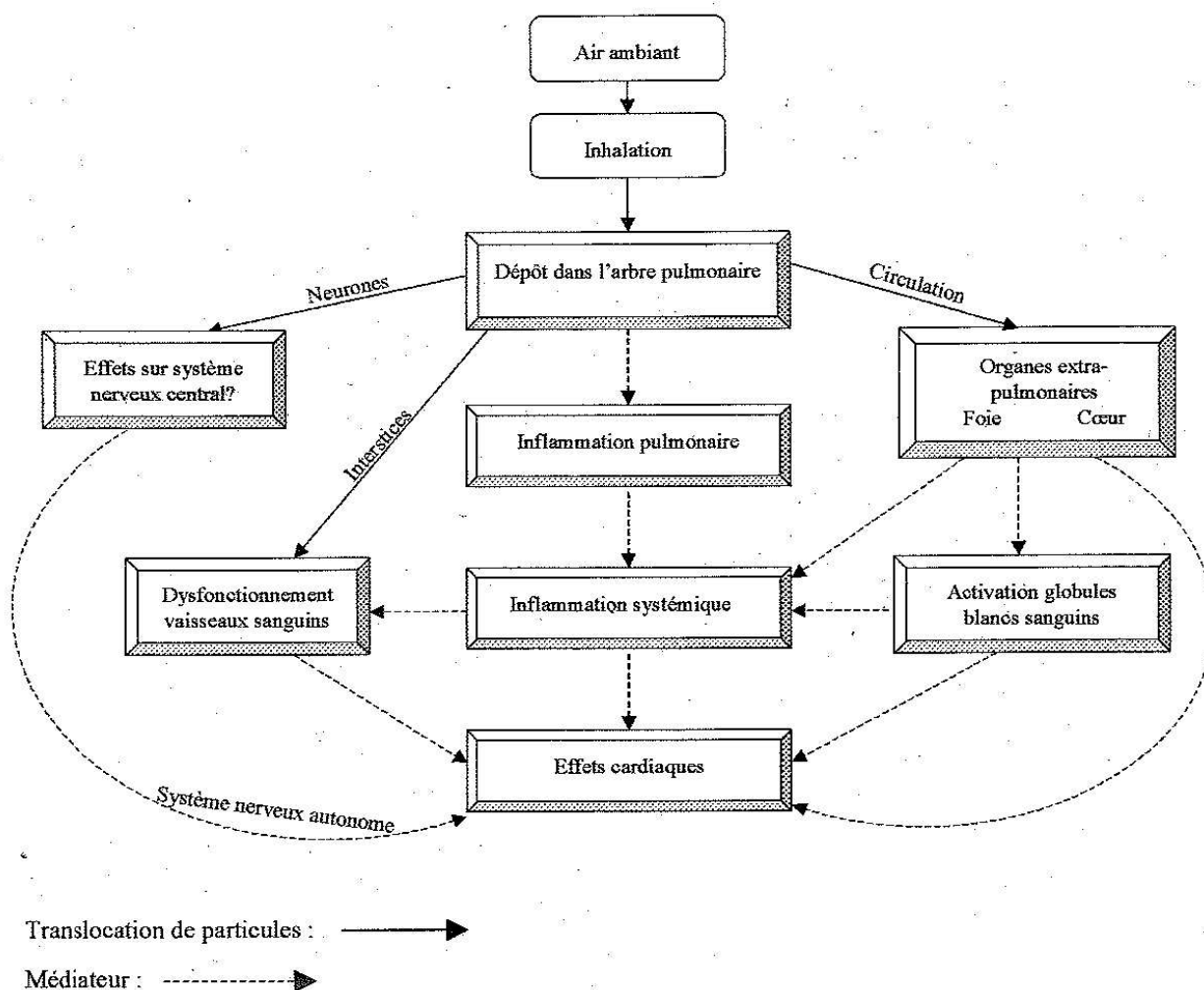


Figure 3
Effets potentiels des PUF inhalées (Dr Gunter Oberdörster, 2005)

¹⁹ Ostiguy C et al - Extrait de « Les effets à la santé reliés aux nanoparticules »-IRSST-mars 2006

5.2. Toxicologie des PUF : études expérimentales

Nous reprendrons ici l'essentiel des recherches d'Abderrahim Nemmar²⁰ et de toute son équipe de la KU Leuven, dans la mesure où elles sont représentatives d'une démarche entreprise par un certain nombre de chercheurs désireux de comprendre les effets des PUF sur les organismes vivants.

L'objectif général de l'ensemble des études consiste à élucider le ou les mécanismes physiopathologiques qui lient la pollution atmosphérique particulaire à la morbidité cardiovasculaire et à la mortalité au sein de la population.

Pour ce faire, durant les années 2000 à 2004, l'équipe de Nemmar a confirmé la réalité du phénomène de translocation chez le hamster (2001) et chez l'homme (2002a), de même qu'elle a étudié les effets des particules sur l'hémostase et la formation des thrombus (2002b, 2003a, 2003b).

5.2.1 Contexte

La pollution atmosphérique reste un enjeu de santé publique majeur dans les villes industrialisées du monde entier.

Cette pollution urbaine consiste en un mélange complexe d'agents gazeux et particulaires. Malgré que certains polluants gazeux, comme l'ozone, jouent un rôle important, les particules inhalables (en anglais, « respirable particles ») constituent l'élément commun à la plupart des études traitant des effets néfastes pour la santé de la pollution atmosphérique urbaine (Samet et coll., 2000).

Plus précisément, la pollution atmosphérique particulaire est associée à une morbidité cardiovasculaire et à une mortalité plus importante, surtout parmi les personnes âgées et les personnes souffrant déjà de maladies cardiovasculaires et respiratoires.

Dès le début des années '90, des études épidémiologiques montrent le lien entre les concentrations de **PM₁₀** et les phénomènes de morbidité et de mortalité attribués à des complications respiratoires et cardio-vasculaires.

Plus récemment, en 2002, l'équipe de Pope démontre, dans une étude réalisée sur 500.000 personnes entre 1979 et 2000, que pour chaque augmentation de 10µg/m³ de **PM_{2,5}** la mortalité « toute cause confondue » augmente de 6 % par an, et la mortalité cardio-pulmonaire de 9 %.

Si de nombreuses études ont établi un lien entre les particules fines (PM₁₀ et PM_{2,5}) et des phénomènes de morbidité et de mortalité, d'autres études, surtout expérimentales, ont questionné la fraction ultrafine des particules atmosphériques. Cette fraction est essentiellement produite par le processus de combustion des moteurs diesel, à l'origine d'une grande partie de la pollution de l'air dans les zones urbaines à haute densité de trafic, avec des concentrations en particules jusqu'à 100.000/cm³ (Shi et coll., 2000).

En 1995 déjà, Seaton et Donaldson incriminent les PUF dans les effets aigus sur la santé (Seaton et coll., 1995). Ensuite, Oberdörster et Nemmar montrent que les PUF se déposent en plus grand nombre et plus profondément que les particules dont la taille est supérieure à 100 nm (Oberdörster et coll., 1996 ; Nemmar et coll., 1999).

De plus, les PUF, qui transportent de grandes quantités de composés toxiques (métaux, hydrocarbures), présentent une plus grande surface réactive que les particules d'une taille supérieure, avec comme conséquence un potentiel plus important en terme de réactions biologiques (réponse inflammatoire, par exemple).

²⁰ Laboratory of Pneumology, Unit of Lung Toxicology, KU Leuven

5.2.2 Etude de la translocation

Les études épidémiologiques ont démontré le lien entre les pics de pollution atmosphérique et l'augmentation des hospitalisations pour maladie cardiovasculaire, ou l'augmentation de l'incidence des arythmies cardiaques, ou encore une susceptibilité accrue à l'infarctus du myocarde, particulièrement chez les personnes âgées ou sujettes à une maladie cardio-pulmonaire préexistante.

Il s'agit donc d'élucider par quel mécanisme des particules inhalées peuvent exercer un effet sur des organes extra pulmonaires.

Trois axes de recherche ont été développés.

Le premier axe est centré sur les effets des **médiateurs inflammatoires** (cytokines, par exemple) produits dans les poumons et déversés dans le flux sanguin, provoquant une inflammation systémique entraînant parfois des décès soudains. Ces médiateurs agiront sur le cœur et la coagulation en favorisant le développement de thrombus déjà présents (Seaton et coll., 1995).

Pour certains chercheurs (Donaldson et coll., 2005), c'est l'inflammation pulmonaire qui joue un rôle clé dans l'apparition de problèmes cardiovasculaires survenant après inhalation de particules.

Le deuxième axe étudie l'impact des particules inhalées sur le **système nerveux autonome**, impact qui se manifeste par des changements au niveau des réflexes respiratoires, du rythme cardiaque et de sa variabilité jusqu'à des dysrythmies fatales (Liao et coll., 1999).

Certains chercheurs défendent un troisième axe qui pourrait expliquer les manifestations aiguës des inhalations de particules sur le plan cardiovasculaire. L'explication repose sur la capacité de **translocation** des PUF, c'est-à-dire la capacité des PUF à passer directement des poumons dans la circulation sanguine et ainsi dans les organes extra pulmonaires.

Cette explication n'exclut nullement les deux autres axes.

Des modèles animaux ont été utilisés pour étudier la translocation, parmi lesquels le hamster (Nemmar et coll., 2001) et le rat (Oberdörster et coll., 2002), après instillation IT²¹ ou inhalation.

Si le phénomène de translocation chez l'animal ne fait plus de doute, les quantités de PUF qui passent dans le sang et les organes extra pulmonaires varient mais il est vrai que les PUF utilisées dans les études concernées diffèrent en taille, en surface, en dose, en voie d'administration, etc.

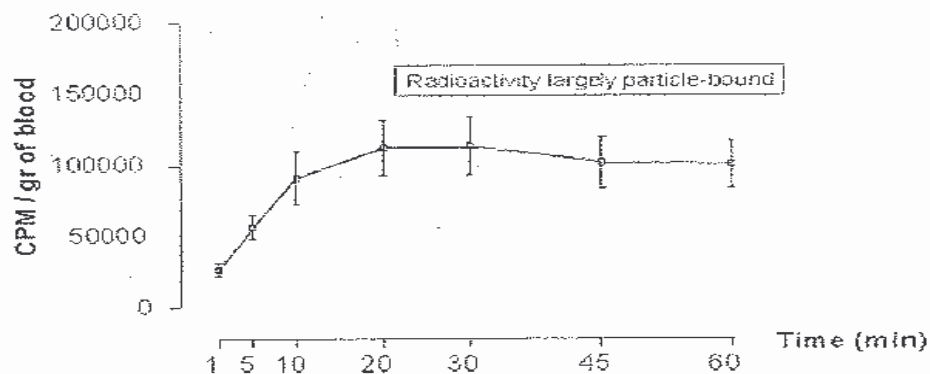
Des études sur des *volontaires humains*, non fumeurs et en bonne santé, inspirant un aérosol de particules de carbone radioactives, très semblables à la fraction ultrafine des particules de pollution atmosphérique, ont été réalisées par Nemmar et ses collègues en 2002.

Dans cette étude, la taille des particules, confirmée par microscopie électronique, se situe entre 5 et 10 nm mais une partie des particules se trouve sous forme de petits agrégats de 20 à 50 nm.

La taille des agrégats est compatible avec les résultats de mesure d'autres études qui indiquent que, la taille des agrégats de particules primaires de diesel se situe entre 10 et 40 nm (Shi et coll., 2000), ou que la taille des agrégats de particules de pollution atmosphériques, issues de processus de combustion, se situe entre 6 et 100 nm (Xiong et Friedlander, 2001).

La radioactivité des PUF de carbone est détectée dans le sang des volontaires dès la première minute qui suit l'inhalation des particules, pour atteindre un maximum entre 10 et 20 minutes, maximum maintenu pendant 60 minutes (voir figure 4 ci-dessous).

²¹ IT : Intra Trachéal(e)



Radioactivity in blood at intervals after Technegas inhalation by five volunteers (means \pm S.E.M., $n = 5$). Modified from Nemmar et al. (2002a).

Figure 4

Evolution de la radioactivité dans le sang des volontaires après inhalation des PUF de carbone.
Source : Nemmar A et al, 2002a.

Conclusion : la translocation des PUF apparaît donc comme un mécanisme qui permet un passage très rapide dans la circulation sanguine et, par conséquent, dans les organes extra pulmonaires. Ce mécanisme expliquerait, au moins en partie, la relation entre l'inhalation de particules et l'apparition de problèmes au-delà du système respiratoire, comme les maladies cardiovasculaires.

5.2.3 Etude de l'inflammation pulmonaire et de l'évolution de la thrombose induite

L'ensemble des expériences successives consiste à provoquer et évaluer les réactions d'inflammation pulmonaire et de thrombose chez des hamsters en leur administrant des particules, essentiellement par voie intra-trachéale (IT).

Afin d'évaluer l'effet de la taille des particules ou de leurs modifications de surface ou encore de leur composition chimique, les groupes de hamsters reçoivent :

- soit des particules de polystyrène (chimiquement inerte) de 60 nm de diamètre :
 - non modifiées, c'est-à-dire neutres
 - avec une charge négative (groupe carboxyle)
 - avec une charge positive (groupe amine)
 - aux doses de 50 et 500 μ g par animal
- soit des particules de 400 nm de diamètre (avec un groupe amine) à la dose de 500 μ g par animal
- soit des particules de diesel produites en laboratoire ou **DEP** (Diesel Exhaust Particles) aux doses de 5, 50 ou 500 μ g par animal

Chaque groupe de hamsters possède un groupe contrôle recevant uniquement le véhicule des particules.

Avant leur instillation IT, des précautions sont prises pour minimiser le phénomène d'agrégation auquel les PUF sont très sensibles.

Nemmar applique aux hamsters le modèle in vivo développé et validé par Kawasaki (1999). Ce modèle (voir figure 5) consiste à induire une lésion endothéliale dans une artère ou une veine fémorale pour provoquer l'apparition d'un thrombus dont on va suivre l'évolution avec un microscope chirurgical.

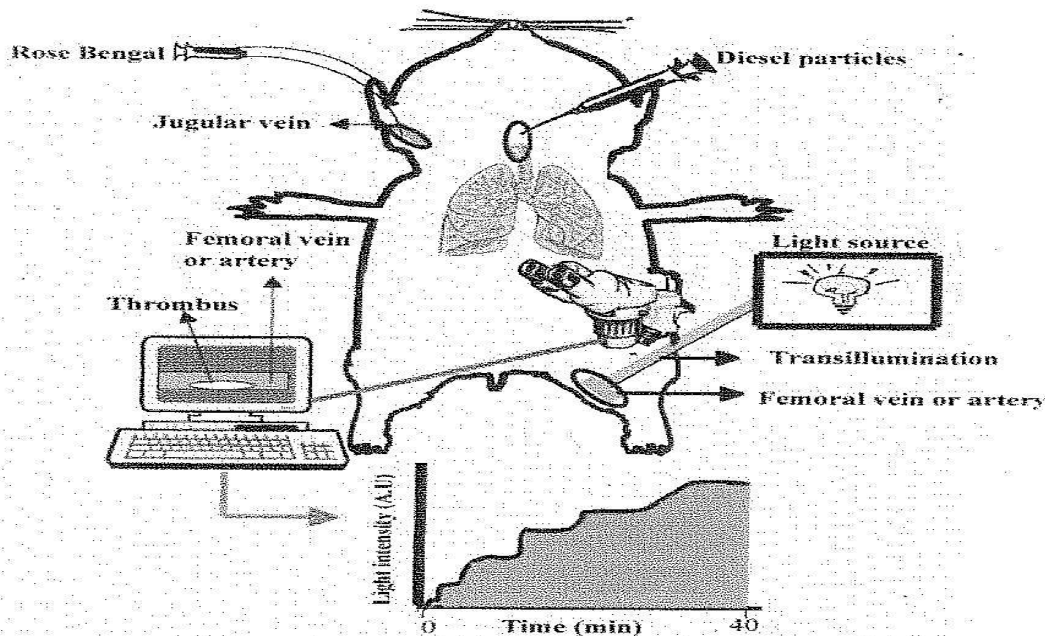


Figure 5

Modèle sur hamster d'une thrombose expérimentale, artérielle ou veineuse. (Nemmar A et al, 2003b).

A. DESCRIPTION ET INTERPRETATION DES ETUDES

1) Particules de polystyrène

Dans les groupes de hamsters recevant des particules de polystyrène, les résultats montrent que l'instillation IT de 500 µg/animal de PUF de 60 nm, neutres ou avec une charge négative, n'a pas d'effet sur le thrombus existant de même que les particules de polystyrène de 400 nm.

Par contre, l'administration de PUF de 60 nm avec une charge positive augmente très nettement la taille des thrombus à des doses de 50 µg/animal (+533%) et 500 µg/animal (+341%).

Une heure après l'instillation IT des particules, les animaux sont sacrifiés et leurs poumons sont « lavés » selon la technique du BAL²² (Nemmar et coll., 2003b).

L'analyse du « lavage », après instillation IT de PUF de 60 nm avec une charge positive, montre un afflux significatif de neutrophiles de 32 ± 6 % pour une dose de 500 µg/animal, et de 10 ± 5 % pour une dose de 50 µg/animal. Les particules de 400 nm provoquent également un afflux de neutrophiles 14 ± 3 %, témoins de l'inflammation pulmonaire.

Dans les autres groupes, l'afflux est non significatif.

Conclusions :

Les modifications de surface des particules semblent influencer leur capacité à exercer des effets in vivo. Ainsi, parmi les particules de 60 nm, seules les particules avec une charge

²² BAL : Bronchoalveolar Lavage

positive (groupe amine) causent inflammation pulmonaire et augmentation de la taille du thrombus.

Cependant, il est important de remarquer qu'il n'existe pas de corrélation entre l'intensité de l'inflammation pulmonaire (maximale à 500µg PUF/animal) et l'importance du thrombus (maximale à 50 µg PUF/animal).

Notons aussi que les « grandes » particules (400 nm de diamètre), qui provoquent une inflammation pulmonaire mais restent sans effet sur le thrombus induit artificiellement, suggèrent que l'inflammation pulmonaire, à court terme (1 heure), ne peut agir sur le thrombus périphérique.

Par conséquent, l'effet des PUF doit être dû, au moins en partie, au phénomène de translocation de ces PUF du poumon vers la circulation sanguine.

2) Particules de diesel avec 1 heure de suivi

Dans les groupes de hamsters soumis aux instillations IT d'un polluant réel, à savoir des particules de diesel ou DEP, l'inflammation pulmonaire se manifeste clairement, endéans la première heure après l'instillation, avec un afflux de neutrophiles dans les alvéoles et une augmentation des protéines totales témoignant d'une perméabilité épithéliale accrue (résultats du BAL).

Les mêmes résultats ont été observés sur des rats, 6 heures après l'instillation IT de particules de noir de carbone (Li et coll., 1997). Chez l'homme, 6 heures après l'exposition à des DEP pendant 1 heure, on note une augmentation des neutrophiles dans la sous-muqueuse bronchique et l'épithélium alvéolaire (Salvi et coll., 1999).

In vivo, on observe un développement du thrombus veineux de type « dose dépendant » dès les plus faibles doses (5 µg DEP/animal), de même qu'une augmentation significative de la formation de thrombus artériels (à la dose de 50 µg DEP/animal).

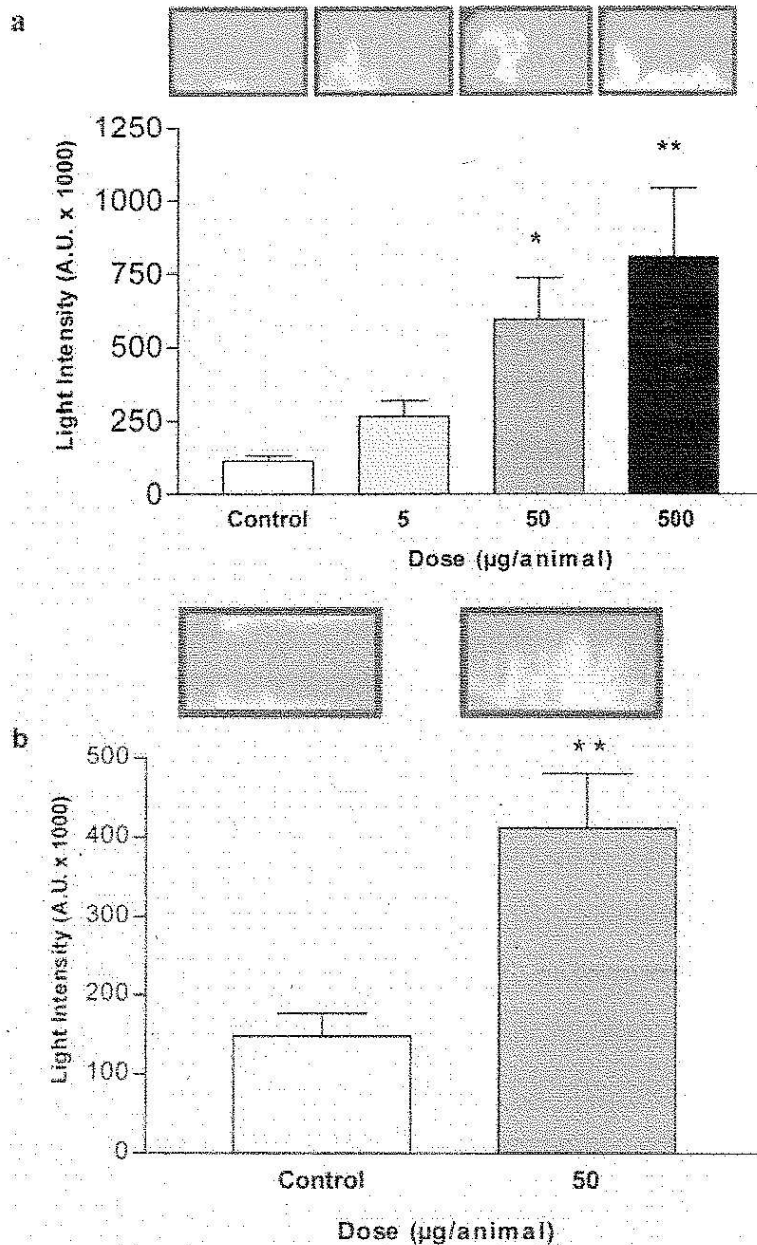
La figure 6a et 6b, ci-dessous, montre une augmentation de l'intensité lumineuse qui suit l'augmentation de la taille des thrombus, induits par lésion photochimique, sous l'effet des instillations de doses croissantes de particules de diesel.

Les effets sur les thrombus des DEP corroborent les observations faites auparavant avec les instillations IT de particules de polystyrène, de 60 nm de diamètre (de taille comparable à celle des DEP) avec une charge positive, qui servent de modèle de PUF. Ces particules amplifient de l'ordre de 5 fois le développement du thrombus dans le « modèle hamster ».

Dans les expériences **ex vivo**, les échantillons de sang des hamsters, ayant reçu la dose de 50 µg de DEP, témoignent d'une diminution progressive du temps de coagulation (après 30 et 60 minutes) avec le test « PFA-100 »²³ révélant une activation plaquettaire (Kundu et coll., 1995).

Enfin, dans les tests **in vitro**, l'addition de DEP à faible dose (0,5 µg/ml sang) au sang de « hamsters témoins » provoque une activation plaquettaire endéans les 5 minutes.

²³ PFA : le Platelet Function Analyser reproduit l'hémostase primaire basée sur l'agrégation des plaquettes sanguines



DEPs enhance venous (a) and arterial (b) thrombus formation. Thrombus generation, expressed as total light intensity over 40 minutes after photochemical injury to the femoral vein (2 minutes) or to femoral artery (1.5 minutes), in hamsters treated, 10 minutes previously, with an intratracheal instillation of saline or DEPs. Representative thrombus at peak intensity appears above each bar. Data are mean+SEM (n=4). ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ by Dunnett multiple-comparison test. AU indicates arbitrary units.

Figure 6

Effets des doses croissantes de DEP sur les thrombus (Nemmar A et al, 2003b).

Conclusions :

Les expériences montrent que les particules de diesel, provenant des gaz d'échappement des véhicules motorisés, causent de l'inflammation pulmonaire et aggravent le phénomène de thrombose endéans la première heure qui suit l'instillation IT des particules.

On attribue la rapidité de l'effet amplificateur sur les thrombus au passage des particules dans la circulation sanguine. Ceci est d'autant plus plausible que la microscopie électronique appliquée aux DEP montre que l'essentiel des particules se trouve sous forme de petits agrégats de 20 à 50 nm de diamètre, ce qui permet de supposer un passage dans la circulation sanguine, comme les PUF de polystyrène de 60 nm chez le hamster (Nemmar et coll., 2001) et chez l'homme (Nemmar et coll., 2002).

Les expériences in vivo, ex vivo et in vitro, suggèrent que le phénomène de thrombose dépend de l'activation des plaquettes sanguines et de leur agrégation, l'activation étant induite par les PUF.

3) Particules de diesel avec 24 heures de suivi

Cette étude se déroule de la même manière que les précédentes, pour évaluer l'inflammation pulmonaire et l'évolution du thrombus créé artificiellement, mais sur **24 heures**, et non plus 1 heure.

Une attention particulière est portée à la libération de l'**histamine** dans le tractus respiratoire et la circulation périphérique (Nemmar et coll., 2003).

L'auteur de l'étude a choisi d'instiller une dose unique de 50 µg DEP/animal, pour tous les groupes de hamsters qui servent de modèle de thrombose aiguë, car cette dose intermédiaire entraîne un développement significatif du thrombus, induit par une lésion endothéliale, et représente probablement une dose pertinente, comparable à l'exposition humaine.

Les résultats de l'étude confirment que l'instillation IT des DEP provoque une inflammation pulmonaire, qui augmente au cours des 24 heures, ainsi qu'un effet stimulant le développement du thrombus déjà induit, effet qui persiste 24 heures au moins.

L'afflux de neutrophiles dans les alvéoles, témoin de l'inflammation des poumons, se retrouve également chez des rats après instillation IT de particules de noir de carbone (Li et coll., 1999), chez des lapins après administration de PUF (Nemmar et coll., 1999) et chez des volontaires ayant respiré des DEP (Salvi et coll., 1999).

On notera que l'inflammation pulmonaire et la thrombose périphérique sont liées aux heures 6 et 24 et pas aux heures 1 et 3.

L'étude in vitro de l'adhésion plaquettaire dans le PFA confirme le rôle des plaquettes dans la thrombose observée in vivo.

L'apport majeur de cette expérience réside dans le suivi de l'**histamine**, qui augmente de manière marquée dans le fluide du BAL en fonction du temps et augmente légèrement dans le plasma à partir de la 6^{ème} heure.

Ces résultats sont à mettre en regard de ceux obtenus chez des volontaires avec, d'une part une augmentation du nombre des mastocytes dans la sous-muqueuse bronchique et, d'autre part un taux d'histamine élevé dans le liquide du BAL, 6 heures après avoir été exposés aux DEP (Salvi et coll., 1999).

Une partie des hamsters, avant d'être soumis aux DEP, est traitée avec la *diphénhydramine*, un principe actif antagoniste des récepteurs de type H1 de l'histamine.

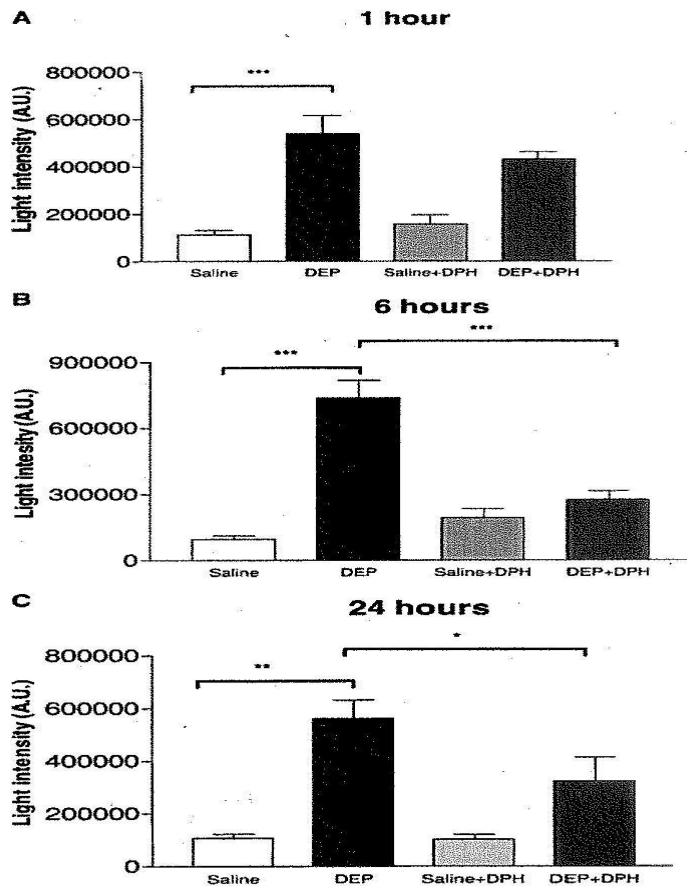
Ce prétraitement par voie intra-péritonéale (IP) n'affecte pas la concentration d'histamine dans le liquide du BAL, ni dans le plasma.

Par contre, la diphénhydramine diminue très nettement l'inflammation pulmonaire.

Le développement in vivo du thrombus n'est pas influencé par le prétraitement diphénhydramine durant la première heure mais, aux heures 6 et 24, il est considérablement réduit, respectivement de 143 % et de 315 %.

La figure 7, ci-dessous, montre l'évolution de la taille des thrombus, induits expérimentalement chez les hamsters soumis à des instillations IT de DEP, avec ou sans prétraitement à la diphénhydramine.

La variation de l'intensité lumineuse représente la variation en taille du thrombus observé.



Prevention of thrombogenicity by DPH. Cumulative thrombus size was assessed 1 (A), 6 (B), and 24 (C) hours after intratracheal instillation of saline or saline containing DEPs (50 μ g per animal) in hamsters with or without pretreatment with DPH (30 mg/kg intraperitoneally). Means \pm SEM (n = 4–5 in each group). ***p < 0.001, **p < 0.01, and *p < 0.05 by Newman-Keuls multiple comparison test. Data for non-DPH-pretreated animals are the same as in Figure 2.

Figure 7

Prévention du développement des thrombus avec le prétraitement diphénhydramine chez les hamsters soumis aux instillations de DEP (Nemmar et al, 2003).

Conclusions :

L'inflammation pulmonaire et le développement de la thrombose périphérique semblent liés aux heures 6 et 24, ce qui signifie que la croissance du thrombus observée 1 heure après l'instillation des DEP ne peut provenir de l'inflammation pulmonaire. On peut supposer que, dans ce cas, l'activation plaquettaire, responsable de l'effet « prothrombique », est due à la pénétration rapide des particules de type DEP dans la circulation sanguine.

Le rôle central de l'**histamine** est mis en évidence par le prétraitement à la diphénhydramine, exerçant un effet antagoniste sur les récepteurs H1, qui lorsqu'ils sont activés par l'histamine agissent sur l'endothélium vasculaire et la musculature lisse des bronches et des vaisseaux.

D'une part, le prétraitement des hamsters inhibe fortement l'afflux des neutrophiles et confirme donc le rôle de l'histamine dans la réaction d'inflammation pulmonaire induite par les DEP.

D'autre part, l'intensité de la thrombose périphérique in vivo et de l'agrégation plaquettaire ex vivo ne sont pas affectés par le prétraitement, durant la première heure après l'exposition aux DEP alors que, dans le même temps, l'inflammation du poumon est totalement inhibée suggérant une dissociation totale entre l'inflammation pulmonaire et le développement de la thrombose au début du processus. La rapidité du phénomène « thrombose périphérique » s'expliquerait à nouveau par un passage très rapide des particules dans la circulation.

Par contre, aux heures 6 et 24, le prétraitement à la diphénhydramine réduit de façon importante la croissance in vivo du thrombus, suggérant une contribution des réactions inflammatoires du poumon plus tardive au développement du thrombus.

4) Particules de diesel et de polystyrène avec 24 heures de suivi

Le même schéma de réalisation des études précédentes est repris ici :

- Modèle de thrombose in vivo sur hamster.
- Instillation IT de 50 µg de DEP.
- Suivi de l'inflammation et du thrombus durant 24 heures.

Origine de l'histamine plasmatique

Dans cette étude-ci (Nemmar et coll., 2004), afin d'étudier les liens entre inflammation pulmonaire et thrombose périphérique, indépendamment d'un passage direct de particules (comme c'est le cas pour les DEP, par exemple) des poumons dans le sang, un groupe de hamsters sera soumis à des instillations IT de particules de polystyrène de 400 nm de diamètre, qui sont incapables de passer la barrière poumon-sang (Ferin et coll., 1992).

Les études décrites plus haut ont montré les signes d'une inflammation pulmonaire et l'absence de développement de thrombus périphériques avec les particules de polystyrène de 400 nm, à la différence des mêmes particules de polystyrène, mais de 60 nm cette fois, entraînant inflammation du poumon *et* effet systémique « prothrombique ».

Dans ce cas-ci, l'expérience menée avec l'instillation de DEP, comparable en taille aux particules de 60 nm, ou de particules de 400 nm, confirme cette différence de résultats en termes d'inflammation et d'effet « prothrombique ».

Les concentrations d'histamine, dans le plasma et dans le liquide du BAL, sont comparables dans les deux groupes de hamsters.

Une question se pose : l'histamine présente dans le plasma, provient-elle d'une diffusion des poumons dans le flux sanguin après dégranulation des mastocytes pulmonaires, ou de la dégranulation des basophiles dans la circulation sanguine ?

Pour répondre à la question, les chercheurs comparent, in vitro, la concentration d'histamine dans le sang avant et après la lyse des basophiles, afin de reproduire la libération in vivo du contenu des basophiles dans la circulation. On constate, chez les hamsters instillés avec les particules de 400 nm ou les DEP, que la concentration en histamine, après lyse cellulaire, est inférieure à celle des hamsters ayant reçu uniquement le véhicule des particules.

Conclusion : l'augmentation de la concentration d'histamine dans le plasma, après instillation des particules, est bien due à l'activation des basophiles sanguins.

Effet de la dexaméthasone et du cromoglycate de sodium

Une partie des hamsters reçoit un traitement anti-inflammatoire, systémique (IP) ou local (IT).

Les paramètres de l'inflammation seront suivis pendant 24 heures pour évaluer les effets des traitements anti-inflammatoires (dexaméthasone ou cromoglycate de sodium) dans le but d'étudier les liens entre libération d'histamine, inflammation pulmonaire et thrombose périphérique.

La DEX (dexaméthasone) est un glucocorticoïde synthétique avec un effet anti-inflammatoire puissant qui, chez les rongeurs, inhibe la libération des médiateurs des mastocytes, dont l'histamine.

L'administration IP de DEX diminue fortement le taux d'histamine dans le plasma et le liquide du BAL, et réduit de 76% l'afflux de PMN et de 60% le processus de thrombose in vivo induits par les DEP.

Des instillations IT de DEX ont également été réalisées, en prétraitement aux instillations de DEP avec pour résultat, une réduction de l'inflammation des voies aériennes et une diminution de l'agrégation plaquettaire périphérique.

L'histamine joue donc un rôle central dans le déclenchement de l'inflammation pulmonaire et des réactions « prothrombotiques » associées.

Pour vérifier que les effets de la DEX proviennent bien d'une inhibition de la libération d'histamine, et non d'une autre action anti-inflammatoire, une partie des hamsters reçoit un prétraitement de cromoglycate de sodium (CS) qui stabilise la dégranulation des mastocytes et des basophiles. On obtient les mêmes résultats qu'avec le prétraitement à la DEX.

Conclusions :

Les résultats obtenus avec les prétraitements de DEX ou de CS sont comparables à ceux obtenus avec le prétraitement antagoniste des récepteurs de type H1.

Ceci nous amène à considérer que la dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine jouent un rôle clé dans le déclenchement des réactions inflammatoires des poumons et des réactions périphériques d'activation plaquettaire.

L'étude (Nemmar et coll., 2004) conclut à l'existence d'un lien direct entre la libération d'histamine, induite par les DEP, et l'inflammation pulmonaire. La stabilisation des mastocytes et les traitements anti-inflammatoires au niveau pulmonaire, qui suppriment la production d'histamine (et réduisent le processus de thrombose périphérique), confirment ce lien.

L'histamine joue donc un rôle central et déclencheur dans l'inflammation des voies respiratoires, de même qu'elle stimule le développement de thrombus périphériques.

B. CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des recherches développées par Nemmar et son équipe, au sein du laboratoire de pneumologie de la KU Leuven, démontre que les particules de pollution atmosphériques, de type DEP, provoquent rapidement une inflammation pulmonaire et une aggravation des thromboses veineuses et artérielles déjà présentes, aggravation due à l'activation des plaquettes sanguines circulantes.

La libération d'histamine par les mastocytes joue un rôle central dans l'inflammation de l'appareil respiratoire. Ces manifestations apparaissent endéans la première heure de l'instillation et persistent au moins 24 heures.

Ainsi, les observations de Nemmar fournissent une explication plausible quant au lien entre l'augmentation de la morbidité cardiovasculaire et de la mortalité, et la pollution de l'air en milieu urbain, comme démontré par les études épidémiologiques, qui relèvent que davantage de personnes décèdent de problèmes cardiovasculaires que de problèmes respiratoires durant les pics de pollution atmosphériques dans les grandes villes (Pope et coll., 1999).

C. COMMENTAIRES

Choix du modèle

L'essentiel des études sur les effets physiopathologiques des PUF est réalisé sur des rongeurs.

L'équipe de Nemmar a choisi d'utiliser le modèle « hamster », développé par Kawasaki en 1999, dans lequel un segment de la veine (ou de l'artère) fémorale est légèrement endommagé pour provoquer un thrombus dépendant de l'activation et de l'agrégation plaquettaire.

Il s'agit d'un très bon modèle pour étudier dans quelle mesure les PUF amplifient le processus de thrombose vasculaire périphérique, sur base d'une lésion endothéliale existante, de façon à

reproduire de la manière la plus réaliste possible la situation dans la population humaine, révélée par les études épidémiologiques.

En effet, le but n'est pas de voir comment les particules provoquent une thrombose chez un animal sain, car il est peu probable que la pollution atmosphérique, en tant que telle, puisse entraîner une thrombose vasculaire qui se manifeste cliniquement.

Le but de ce modèle est de reproduire ce que les études épidémiologiques démontrent clairement, à savoir que dans la population générale, la pollution atmosphérique va provoquer des complications cardiovasculaires pour une partie de la population, déjà plus susceptible de développer des « accidents » de type thrombose comme les personnes âgées ou les personnes souffrant de problèmes cardiovasculaires.

Précisons que la majorité des expériences se fait sur la veine fémorale et une minorité sur l'artère fémorale car le thrombus produit par le flux veineux, moins puissant que le flux artériel, est plus stable.

Choix de la dose

Les doses de DEP, administrées aux hamsters, varient de 5 à 500 µg/animal, la dose la plus utilisée étant celle de 50 µg. Ces doses sont largement inférieures aux doses massives utilisées dans d'autres études. Pourquoi Nemmar fait-il le choix de doses relativement faibles ?

Il faut rappeler que la concentration en particules dans l'air ambiant de la plupart des grandes villes est très élevée, avec des moyennes annuelles de 200 à 600 µg/m³ et des pics de concentration de 1000 µg/m³ et plus. Considérant qu'un homme adulte inhale, en moyenne, un volume d'air de 20 m³ en 24 heures, cela signifie que celui-ci peut inhaler jusqu'à 20 000 µg de particules lors des pics de pollution.

Ramenées à un hamster de 100 g environ, les quantités inhalées devraient être de 30 µg environ ou plus, c'est-à-dire assez proches des doses administrées par Nemmar à ses hamsters.

Par conséquent, les doses étudiées ici (de 50 à 500 µg) sont pertinentes et sans doute proches d'un scénario réaliste d'exposition, particulièrement celles de 50 µg.

Choix de la voie

Nemmar et ses collègues reconnaissent que l'administration par **instillation intra trachéale** d'une dose unique de particules est discutable sur le plan physiologique.

En effet, une telle forme d'administration de particules, non pas répartie sur 24 heures, mais sous forme d'un bolus, peut être considérée comme non physiologique.

Cependant, l'instillation IT présente l'avantage de délivrer une dose précise dans les poumons de l'animal, sur un laps de temps très court, avec une technique plus simple que l'inhalation, plus difficile à mettre en œuvre en laboratoire car nécessitant des structures d'exposition particulières et adaptées aux rongeurs.

A ce sujet, le laboratoire de M.Osier à New York (Osier et Oberdörster, 1997) a développé une méthode d'**inhalation intra trachéale** sur des rats afin d'éviter les inconvénients des systèmes d'inhalation destinés au nez uniquement ou à l'ensemble du corps.

Cette étude a comparé 2 groupes de rats, recevant les mêmes doses de particules fines (250 nm) ou des PUF (21 nm), soit par instillation IT, soit par inhalation IT.

Il apparaît que les rats exposés aux particules par inhalation manifestent une réaction inflammatoire pulmonaire moins forte en intensité et en durée, comparés aux rats traités par instillation.

Cette étude, comparant 2 modes d'administration différents, nous amènent à considérer les résultats de l'équipe de Nemmar avec une certaine prudence.

De plus, l'instillation, qui consiste à disperser les particules dans un milieu liquide pour l'administrer ensuite dans les voies respiratoires, présente un risque de modifications des propriétés physico-chimiques de l'aérosol d'origine.

Néanmoins, cette restriction au sujet du mode d'administration des particules n'enlève rien à l'intérêt que présentent les études de l'équipe de Nemmar.

5.3. Toxicologie des nanoparticules manufacturées

Le présent chapitre est centré sur les NP synthétisées avec un objectif de production industrielle pour les classes de produits suivants : fullerènes, nanotubes de carbone mono et multiparois, NP organiques et inorganiques, puits quantiques et nanocapsules.

Nous distinguerons d'emblée les NP solubles et insolubles ou très peu solubles.

Les NP solubles se dissolvent et leurs effets toxiques sont liés à leurs différentes composantes, indépendamment de la taille initiale des particules. Par conséquent, ces effets ne seront pas décrits ici.

Pour les NP insolubles ou très peu solubles, les données sur leur toxicité sont limitées et ne permettent pas d'évaluer le risque de manière quantitative.

Aussi, il apparaît impératif d'améliorer nos connaissances au sujet des effets toxiques potentiels des NP manufacturées, dans la mesure où, non seulement, le domaine des NP constitue un terrain de recherche en pleine croissance, mais aussi un marché avec des produits commercialement disponibles aujourd'hui et utilisés par des millions de consommateurs.

Le nombre de travailleurs exposés sera également de plus en plus grand, durant les opérations de production et de transformation, au cours des prochaines années.

Les études concernant les propriétés toxicologiques des NP demeurent fragmentaires, principalement à cause de la grande diversité des matériaux à étudier.

Cependant, ces études ont déjà permis de montrer que certaines particules (insolubles ou peu solubles) sont capables de franchir les barrières de protection des organismes vivants et de produire des effets délétères chez l'animal.

Des études additionnelles, ciblant par exemple l'absorption, la translocation, la biopersistence ou la cancérogénicité, sont nécessaires pour évaluer le risque lié à l'exposition des travailleurs et de plus en plus, le risque lié à l'exposition des consommateurs, sachant que la diversité, la production commerciale et l'utilisation des nanomatériaux augmenteront au fur et à mesure du développement de nouvelles applications.

De plus, les PUF, issues de la pollution atmosphérique et dont les propriétés granulométriques sont comparables à celles des NP, produisent des effets toxiques sur de nombreux organes.

Par conséquent, les NP synthétisées avec un objectif d'utilisation industrielle devraient être manipulées avec prudence en attendant une meilleure connaissance de leur toxicité réelle même si le domaine des NP constitue une aire de recherche en plein développement, avec à la clé des enjeux industriels et commerciaux gigantesques.

5.3.1 Déterminants possibles des effets toxiques

Généralement, la composition chimique est le principal déterminant de la toxicité d'un composé.

Pour les NP, la chose est beaucoup plus complexe puisque les nombreuses propriétés physico-chimiques propres aux NP semblent intervenir dans la toxicité de celles-ci.

Ainsi, ce sont les propriétés particulières des NP manufacturées, qui intéressent l'industrie et le monde biomédical, qui peuvent être source de toxicité.

Les études dont on dispose actuellement pour les NP manufacturées et les études sur les PUF de la pollution atmosphérique laissent penser que les facteurs suivants seraient impliqués dans les effets toxiques des NP produites industriellement :

➤ *la taille*

La taille nanométrique des particules leur confère des propriétés biologiques particulières, à savoir, une réactivité de surface augmentée et une disponibilité accrue vis-à-vis des cellules.

De fait, la taille des NP leur permet de pénétrer plus facilement dans les cellules et de passer les barrières au sein des organismes pour être distribuées dans différents organes.

➤ *l'aire et la réactivité de surface*

Lorsque la taille d'une particule diminue, la proportion d'atomes exposés en surface (surface spécifique) augmente de manière exponentielle de même que l'énergie de surface.

Puisque les réactions chimiques se produisent à la surface des particules, cela signifie que la réactivité d'une même masse de NP sera plus grande que celle des particules de même composition mais de taille supérieure.

➤ *le nombre de particules*

Peu d'études expérimentales ont envisagé le paramètre « nombre de particules ».

Nous retiendrons l'étude de Ferin et coll. (1992) sur des rats avec des instillations et des inhalations de particules fines et ultrafines de dioxyde de titane qui montre que l'augmentation du nombre des particules (ou la diminution de leur taille) favorise la rétention dans le parenchyme pulmonaire, et donc la pénétration cellulaire.

➤ *la forme*

Les NP manufacturées existent sous forme de sphères, de fibres, de tubes, de feuillets, etc. Malheureusement, peu d'expériences étudiant les formes et la toxicité des NP sont disponibles aujourd'hui.

Des études in vitro, sur des macrophages alvéolaires de rat exposés à des particules micrométriques de dioxyde de titane sous forme de sphères et de fibres montrent une toxicité cellulaire uniquement pour les macrophages exposés aux fibres de TiO₂. Ces résultats doivent nous rendre prudents par rapport à l'usage des mêmes particules sous forme nanométrique.

➤ *la capacité à former des agglomérats et des agrégats*

La signification des agglomérats et des agrégats dans la réponse biologique des NP n'est pas encore bien comprise.

Cependant, on peut penser que la formation des agglomérats et agrégats va modifier la déposition des NP dans le tractus respiratoire, en raison d'un diamètre aérodynamique différent.

➤ *le traitement de surface*

Dans les étapes finales de production, les surfaces des NP sont souvent enrobées ou modifiées en fonction de l'application industrielle prévue.

Ces traitements de surface auront un effet majeur sur l'innocuité ou non des NP. Par exemple, des nanoparticules de TiO₂ non enrobées induisent une réponse inflammatoire pulmonaire chez le rat. La même concentration de NP enrobées n'entraîne pas de réaction (Warheit et coll., 2005).

➤ *la structure*

Les effets biologiques et toxiques peuvent être conditionnés par la structure de la NP, comme avec la silice où la structure cristalline offre une surface anfractueuse, présentant de

nombreux groupements réactifs, qui va de pair avec des effets toxiques plus importants (Elias et coll., 2000).

➤ *la notion basique de composition chimique, mais aussi les composants de surface*

La présence de métaux de transition dus au processus de fabrication des NP, ou la nature métallique des particules elles-mêmes, peuvent participer aux effets toxiques des NP, en produisant, par exemple, des formes réactives de l'oxygène.

Dans le cas du fer, la toxicité de différents types de nanotubes de carbone sur des kératinocytes est fonction de la quantité de fer provenant du processus de fabrication (Shvedova et coll., 2003).

➤ *le « vieillissement » des NP*

On dispose de très peu de données sur l'effet du vieillissement des NP.

Une étude a mis en évidence le fait que laisser « vieillir », pendant quelques minutes, des PUF de polytétrafluoroéthylène, nouvellement formées par chauffage, provoque leur agglomération et la disparition des effets toxiques chez le rat (Oberdörster et coll., 2000).

Les études à mener pour élucider la toxicité spécifique des NP sont d'autant plus complexes que les déterminants physico-chimiques sont nombreux et qu'ils peuvent agir entre eux.

5.3.2 Mécanismes toxiques potentiels

1. Stress oxydant

In vivo et in vitro, de nombreuses études suggèrent que les PUF et les NP, de taille et de composition variables, induisent un stress oxydatif au niveau cellulaire, particulièrement lorsqu'il y a exposition à la lumière, aux UV ou aux métaux de transition.

Le stress oxydant provient d'un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants lorsque la production des formes réactives de l'oxygène (ROS)²⁴ dépasse la capacité des systèmes antioxydants de l'organisme.

La concentration de formes réactives de l'oxygène peut entraîner une oxydation de lipides, de protéines ou d'acides nucléiques et causer une perte de fonction au sein de la cellule.

Il a été démontré que les NP se localisent préférentiellement dans les mitochondries qui constituent les sites des réactions d'oxydo-réduction. Cette localisation pourrait modifier la production des formes réactives de l'oxygène et perturber ou surcharger les mécanismes antioxydants.

Ainsi, le stress oxydatif cellulaire expliquerait la genèse des effets toxiques des NP manufacturées (Afsset-Juillet 2006 ; Oberdörster, 2005).

2. Réaction inflammatoire

L'inflammation est une réaction non spécifique à toute agression vis-à-vis de l'organisme.

La littérature au sujet des particules montre que les NP induisent une réaction inflammatoire plus importante que la réaction induite par les mêmes particules, mais de taille micrométrique.

Cette réaction inflammatoire, associée à l'induction d'un stress oxydant, peut diminuer progressivement. Sinon, la réponse inflammatoire entraînera la dysfonction de l'organe.

5.3.3 Effets toxiques des NP

Les connaissances actuelles des effets toxiques concernant les NP manufacturées (et insolubles, en particulier) s'avèrent relativement limitées.

²⁴ ROS : Reactive Oxygen Species

La lecture des rapports produits, par exemple, par la France (Afsset, juillet 2006), par le Canada (IRSST, mars 2006) ou par l'Europe (SCENHIR, mars 2007) met en lumière le nombre important de situations pour lesquelles il n'existe **aucune information** actuellement disponible.

Le manque de données ne permet pas, malheureusement, de procéder à une évaluation quantitative du risque pour les NP de synthèse.

Néanmoins, les données disponibles, même si elles sont limitées, indiquent que certaines NP insolubles franchissent les différentes barrières de protection de l'organisme pour se distribuer dans plusieurs organes, s'accumuler dans certains de ceux-ci et exercer des effets toxiques.

1. Effets pulmonaires

L'essentiel de nos connaissances provient d'études réalisées sur des rongeurs de laboratoire.

Les études de toxicité pulmonaire chez le rat montrent que les particules de taille nanométrique provoquent une réaction inflammatoire plus importante que celle provoquée par des particules de même composition chimique, à concentration de masse équivalente mais de taille supérieure.

A titre d'exemple, l'étude de G. Oberdörster (2000), avec des rats et des souris exposés à des particules de TiO₂ par instillation IT, met en évidence une réponse pulmonaire inflammatoire bien plus marquée (après analyse du BAL²⁵) chez les rongeurs recevant des NP de 20 nm, par rapport aux rongeurs recevant des particules fines de 250 nm avec la même dose massique.

L'aire de surface et le nombre de particules semblent donc jouer un rôle déterminant dans la toxicité pulmonaire à dose massique comparable.

Cependant, il ne faudrait pas tirer de conclusions trop rapides car la taille de la particule n'est pas le seul facteur qui influence la toxicité des NP.

En effet, plusieurs études (Rehn B et coll., 2003) réalisées dans les mêmes conditions, mais avec une modification de la chimie de surface des NP, montrent une toxicité plus importante avec les particules fines !

L'essentiel des études de ce type est réalisé avec le rat, animal particulièrement sensible aux effets pulmonaires des particules qui développe facilement des réactions tumorales, par exemple.

Dans des conditions identiques, le hamster et la souris ne développent pas les mêmes réactions.

Il faut en tenir compte lors de l'**extrapolation** des résultats à l'homme.

D'autres facteurs, davantage détaillés dans le chapitre 5.3.1 « déterminants possible des effets toxiques », influencent encore la toxicité pulmonaire des NP :

- les méthodes de synthèse (phase gazeuse, phase liquide, modifications « post synthèse »)
- les enrobages (« surface coatings »)
- le degré de « vieillissement » des particules après leur synthèse
- les charges en surface des particules
- la formation d'agglomérats et/ou d'agrégats

En conclusion, même si la taille est un facteur particulièrement important, il n'est pas le seul à déterminer les effets sanitaires des NP.

En conséquence, dans la mesure où les facteurs déterminants les effets toxiques pulmonaires sont nombreux, et les études, elles, peu nombreuses, il est impossible de tirer des conclusions générales.

²⁵ BAL : Broncho Alveolar Lavage

Aussi, lors de la production de nouvelles NP manufacturées, l'évaluation des risques pour la santé devra se faire **au cas par cas**.

2. Effets sur le système réticulo-endothélial

Les cellules du système réticulo-endothélial (SRE) sont les macrophages, les monocytes et les cellules endothéliales spécialisées présentes dans le foie, la rate et la moelle osseuse.

La fonction majeure des cellules du SRE, situé dans le foie, consiste à neutraliser d'éventuels agents pathogènes provenant du tractus digestif. Ces cellules vont également phagocyter les NP absorbées par le tube digestif.

Les conséquences de la phagocytose des NP par les macrophages ne sont pas encore connues mais des études in vitro montrent que des NP à toxicité faible, comme le noir de carbone et le polystyrène, stimulent les macrophages, via les formes réactives de l'oxygène, à produire des cytokines pro-inflammatoires qui peuvent être associées à des pathologies hépatiques.

C'est pourquoi, l'impact des NP sur le foie et le SRE doit encore être étudié.

3. Effets cardio-vasculaires

Des NP de synthèse sont étudiées depuis des années pour être utilisées en imagerie moléculaire ou comme vecteurs de médicaments. Ces recherches ont permis de mieux comprendre les propriétés des particules qui sont susceptibles d'influencer la pénétration tissulaire.

Cette meilleure compréhension du comportement des NP devrait permettre d'éviter les effets des expositions aux PUF ou, au moins, de fournir une explication définitive aux risques accrus auxquels sont exposées les personnes souffrant de maladies cardiovasculaires et inhalant des PUF issues de la pollution atmosphérique.

A ce jour, les résultats des études épidémiologiques et des études expérimentales avec les PUF fournissent des hypothèses très intéressantes mais pas de réponse définitive.

4. Effets sur le système nerveux central

Les NP ont accès au cerveau de deux manières :

- par voie trans-synaptique, à partir de l'épithélium olfactif, après inhalation de carbone, d'or ou de dioxyde de manganèse dans des modèles expérimentaux.
- par passage de la barrière hémato-méningée.

De nombreuses recherches ont été menées pour modifier la surface des particules étudiées dans le but d'acheminer des médicaments dans le cerveau.

Ces recherches confirment qu'une barrière hémato-méningée saine va limiter le passage et la distribution de protéines, de particules virales et vraisemblablement de NP aussi.

Cependant, certaines pathologies (hypertension, encéphalomyélite allergique) et des modifications de surface des NP sont associées à une perméabilité accrue de la barrière hémato-méningée !

Sachant que les NP induisent la production de formes réactives de l'oxygène qui oxydent les lipides, il est impératif d'étudier l'impact des NP sur les tissus neuronaux.

5. Effets cutanés

Les préparations cosmétiques actuelles contiennent très souvent des particules dont la taille varie de 50 à 500 nm.

Ces particules permettent d'étaler la préparation de manière plus homogène sur la peau ou servent de filtres UV lors d'expositions au soleil.

C'est pourquoi, certaines NP se retrouvent dans les crèmes solaires ou dans des produits de soin pour la peau, utilisés au quotidien.

Des préparations cosmétiques contenant des NP d'oxyde de zinc ou de titane ont subi des tests, *in vivo*, de pénétration percutanée et, *in vitro*, de phototoxicité et de photogénotoxicité.

D'après ces études, il semble que, chez l'être humain, les NP présentes dans les produits cosmétiques ne pénètrent pas la peau et que, dans ce cas, l'exposition systémique aux NP ne puisse se faire.

En conséquence, l'exposition cutanée aux NP représenterait un très faible risque pour la santé humaine. Mais la question se pose peut être pour l'environnement.

Ces données sont basées sur des études réalisées sur une peau saine et sans lésions. Dans le cas contraire, on se trouverait probablement dans la situation décrite par Kim et ses collègues (2004) qui ont procédé à des injections intradermiques de quantum dots, chez des souris et des porcs, et qui ont montré, qu'une fois dans le derme, les NP se localisaient dans les nodules lymphatiques régionaux.

Si cette localisation peut se révéler très utile pour l'imagerie médicale *in vivo*, cela signifie aussi que les NP pourraient, d'une part stimuler le système immunitaire et d'autre part, entrer dans la circulation systémique.

Actuellement, on dispose donc de tests réalisés avec des produits cosmétiques contenant des NP, sur des peaux saines, or les affections dermatologiques qui portent atteinte à l'intégrité de la surface cutanée sont nombreuses et souvent courantes dans la population (dermatite atopique, psoriasis, acné,...). Ces affections pourraient donner accès au derme avec les conséquences décrites plus haut.

Conclusion

Les connaissances actuelles des effets toxiques des NP manufacturées sont limitées. La consultation de la bibliographie disponible sur le sujet fait état de beaucoup de zones d'ombre et de très peu de réponses aux questions de toxicité et de sécurité que l'on est en droit de se poser.

Le tableau ci-dessous, inspiré du rapport de l'IRSST²⁶ (Ostiguy et coll., 2006), mentionne dans chaque case le nombre d'études disponibles et illustre la situation de nos connaissances, mais encore plus de nos méconnaissances !

²⁶ IRSST-Les effets à la santé reliés aux nanoparticules-rapport de mars 2006

	Fullerènes	NTC	NP inorgan.	NP organ.	Quant. dots
Toxicocinétique					
Absorption	0	0	2	0	2
Distribution	3	5	9	7	1
Métabolisme	1	0	0	0	0
Excrétion	1	1	1	0	0
Effets :					
Par inhalation					
Sur organes	0	4	4	0	0
Immunologiques	0	0		0	0
Sur reproduction	0	0		0	0
Sur développem.	0	0		0	0
Génotoxiques	0	0		0	0
Cancérogènes	0	0		0	0
Cellulaires	0	0		0	0
Par exposition cutanée					
Sur organes	0	1	2	0	0
Immunologiques	0	1	0	0	0
Sur reproduction	0	0	0	0	0
Sur développem.	0	0	0	0	0
Génotoxiques	0	0	0	0	0
Cancérogènes	1	0	0	0	0
Cellulaires	0	0	0	0	0
Par ingestion	1 (DL ₅₀)				
Sur organes	0	0	0	0	0
Immunologiques	0	0	0	0	0
Sur reproduction	0	0	0	0	0
Sur développem.	0	0	0	0	0
Génotoxiques	0	0	0	0	0
Cancérogènes	0	0	0	0	0
Cellulaires	0	0	0	0	0
Autres voies					
Sur organes	1	2	3	2	0
Immunologiques	0	0	0	1	0
Sur reproduction	0	0	0	0	0
Sur développem.	1	0	1	0	1
Génotoxiques	3	1	0	2	0
Cancérogènes	0	0	1	0	0
Cellulaires	3	2	8	0	4

Ce tableau permet de visualiser le nombre de situations où nous ne disposons pas d'informations et ces situations sont beaucoup plus nombreuses que celles où il existe des informations disponibles.

De plus, quand des données existent, elles se limitent souvent à une seule étude dont on peut difficilement tirer des conclusions générales.

C'est pourquoi, le Comité Scientifique européen sur les risques sanitaires émergents et nouvellement identifiés (SCENHIR²⁷) conseille de développer de nombreuses études sur les NP, au cas par cas d'abord, pour essayer ensuite de trouver des éléments fédérateurs.

Les experts considèrent que la Communauté européenne devrait revoir la pertinence du cadre réglementaire actuel recouvrant l'introduction de NP dans les produits de grande consommation.

²⁷ SCENHIR: Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks

6. Particules ultrafines, nanoparticules manufacturées et environnement

Nous avons choisi de regrouper dans un même chapitre les effets des PUF et des NP manufacturées sur l'environnement dans la mesure où ce sont les mêmes questions qui se posent ...et les mêmes lacunes qui apparaissent.

Pour déterminer l'impact des NP sur l'environnement, les scientifiques français, qui ont rédigé le rapport « Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement » en juillet 2006, posent les questions suivantes :

- Quelles sont les quantités rejetées dans l'environnement ?
- Quelle est la distribution dans l'environnement (air, eau, sol) ?
- Quels sont les lieux d'accumulation préférentiels ?
- Quelles sont les conditions de persistance ou de dégradation ?
- Quelle est l'écotoxicité des NP ?

Ces questions restent valables pour essayer de déterminer l'impact des PUF sur l'environnement.

6.1 Effets des PUF sur l'environnement

Les *quantités* de PUF, de sources anthropogéniques rejetées dans l'environnement sont estimées à, approximativement, 50 tonnes par an (Borm et coll. for ECETOC²⁸, 2006).

La distance parcourue par les particules est inversement proportionnelle à leur taille. Les grosses particules (plus grandes que 5 µm) ne se déplacent guère au-delà de 500 km tandis que les particules fines peuvent se déplacer sur des milliers de kilomètres.

Le temps de résidence des particules dans l'atmosphère sera fonction de leur taille et de leur composition. Les particules fines retombent au bout de quelques jours alors que les PUF séjournent, en moyenne, 2 ans en altitude.

Nous n'avons pas trouvé de données sur la *distribution* et l'*accumulation* potentielle des PUF dans les différents compartiments de l'environnement de même que sur leur *dégradation*.

Au niveau européen, il existe très peu d'informations au sujet des impacts de la matière particulaire sur l'environnement.

L'Agence américaine de Protection de l'Environnement (US-EPA) a produit davantage d'informations sur le sujet, en conduisant des études concernant les effets des particules atmosphériques sur les écosystèmes, la visibilité et les matériaux (EPA, 2004a).

Remarquons cependant que les données concernent la matière particulaire en général et non la fraction ultrafine en particulier.

En termes d'*écotoxicité*, le dépôt des particules atmosphériques, sur le sol comme sur les végétaux, produira des effets directs et indirects.

La composition chimique des particules déposées sur le sol pourra modifier l'écosystème constitué par le sol où cohabitent, dans un équilibre délicat, des communautés de bactéries et de champignons qui participent à la mise à disposition des végétaux, d'éléments nutritifs.

Par conséquent, les changements dans la composition chimique des sols, dus aux dépôts de particules acides ou basiques, chargées de métaux bien souvent, vont modifier l'activité mycotique et bactérienne et donc affecter les végétaux.

²⁸ ECETOC : European Centre for Ecotoxicology & TOxicology of Chemicals

Les dépôts de nitrates et de sulfates, contenus dans les particules, auront des effets très importants sur la croissance des végétaux.

Ainsi, l'acidification (due en grande partie aux sulfates des particules) dégradera les forêts mais aussi les lacs et les cours d'eau.

Dans le même ordre d'idée, l'eutrophisation (résultant en partie des nitrates contenus dans les particules) perturbera le fonctionnement des écosystèmes terrestres et aquatiques.

Les niveaux d'azote augmentant dans le sol, des plantes nitrophiles vont remplacer les plantes initialement présentes et occasionner une perte de biodiversité.

Dans les cours d'eau et les lacs, les excès de nitrates stimuleront de manière excessive la croissance des algues avec des conséquences diverses qui mèneront, là aussi, à une perte de biodiversité.

Les particules peuvent altérer les végétaux de manière directe.

En effet, les dépôts de particules qui se font directement sur les feuilles diminuent l'apport de lumière, réduisant ainsi l'efficacité de la photosynthèse.

La composition chimique des particules déposées sur les feuilles peut être à l'origine d'une nécrose de celles-ci, rendant les végétaux plus vulnérables aux maladies et à l'attaque des parasites.

Actuellement, nous ne disposons malheureusement pas de davantage d'informations.

6.2 Effets des nanoparticules manufacturées sur l'environnement

La dispersion dans l'environnement est un phénomène majeur dans le devenir des substances chimiques, quelle que soit leur taille.

Une fois introduites dans l'environnement, les NP contaminent les différents compartiments dont l'air, le sol, l'eau et donc potentiellement les organismes vivants.

Leur petite taille rend les NP très mobiles dans l'environnement et permet leur transfert d'un milieu à l'autre. La connaissance de leur taille mais aussi de leurs autres caractéristiques physico-chimiques est indispensable pour évaluer les interactions des NP avec le milieu.

Face aux énormes investissements en R&D en faveur des NP et nanomatériaux, et face à leur commercialisation de plus en plus importante, mais dans le même temps, face aux très nombreuses questions sans réponse quant à leurs effets sur l'environnement et donc sur l'homme, de nombreux pays ont initié des programmes de recherche.

C'est le cas des Etats-Unis où l'Agence de Protection de l'Environnement effectue des recherches sur l'adsorption de polluants par les NP manufacturées ou sur le comportement des NTC²⁹ dans les sédiments estuariens. Les résultats sont attendus prochainement.

La Commission européenne a mis en place une section dédiée aux nanotechnologies. Parmi les programmes qu'elle soutient, le programme intégré 2005-2009 « Nanosafe 2 » s'efforce d'évaluer l'exposition, la toxicologie et les risques de certaines NP tout au long de leur cycle de vie.

6.2.1 Dispersion des NP dans le milieu naturel

Le **milieu atmosphérique** est le milieu privilégié pour la dispersion de toutes les fractions de la matière particulaire dans l'environnement.

Comme les PUF, les NP pourraient être facilement dispersées dans l'atmosphère et transportées sur de très longues distances, distances qui dépendront non seulement de la taille des NP mais aussi de leur réactivité chimique qui provoquera l'adsorption de polluants, également présents dans l'air.

Le diamètre des particules augmentant avec l'adsorption de polluants, celles-ci se déposeront plus rapidement par sédimentation.

Une grande partie des prédictions quant au comportement des NP est basée sur le comportement des PUF provenant des processus de combustion ou de procédés industriels.

Or, les études réalisées sur les PUF montrent que les particules ont généralement tendance à former des agrégats qui se déposent au sol en quelques jours seulement.

²⁹ NTC : NanoTube de Carbone

Les NP manufacturées resteraient plus longtemps dans l'atmosphère car elles subissent souvent un traitement post-synthèse pour éviter le phénomène d'agrégation.

Il faut toutefois rester prudent avec ces considérations car chaque type de NP produite possède des caractéristiques et un mode de production propres.

Les propriétés physiques du **sol** (porosité et perméabilité) de même que les caractéristiques physico-chimiques des particules (granulométrie, structure, réactivité, ...) déterminent le transfert de celles-ci dans le sol.

Les conditions climatiques (pluviométrie, température) influencent également le transfert des particules.

Du fait de leur taille, on suppose que les NP sont mobiles dans les sols.

Il existe encore très peu d'études aujourd'hui qui soient spécifiquement consacrées à la mobilité des NP dans les sols.

On dispose de quelques études sur la mobilité des nanomatériaux réalisées en laboratoire. Les expériences de Lecoanet et coll. (2004) ont étudié la mobilité d'une série de nanomatériaux (silices, anatase, ferroxane, alumoxane, fullerol, fullerène et NTC) en milieu poreux représenté par une colonne remplie de billes de verre traversée par une eau comparable aux eaux souterraines.

Conclusion : la mobilité des différentes NP étudiées est très variable, le fullerène étant la NP la moins mobile.

Dans les mêmes conditions expérimentales, Lecoanet et Wiesner (2004) ont évalué la capacité de déposition de ces NP, montrant que cette capacité augmente avec le temps, ce qui signifie que les NP déjà déposées attirent plus les particules suivantes par rapport à un support vierge.

La qualité du sol, mais aussi des eaux souterraines, pourra être altérée par la formation de complexes constitués de NP ayant fixé des polluants (métaux lourds, pesticides ou HAP³⁰). Les NP, dans ce cas, favorisent le transport de polluants peu mobiles.

Nous ne disposons pas encore d'études spécifiques concernant la *persistance* des NP dans les sols mais les données relatives à la décontamination, par des NP, des sols et des aquifères pollués pourront bientôt fournir des indications sur la persistance des particules de taille nanométrique.

En effet, des projets de décontamination de boues et d'effluents, contaminés par des substances toxiques, font déjà l'objet de brevets pour l'exploitation du Ferroxane et de l'Alumoxane³¹, NP destinées à la fabrication de membranes de nanofiltration par un procédé top-down (Cortalezzi et coll., 2003).

Mais la question du retraitement des NP se pose encore.

Des NP peuvent se retrouver dans les **eaux de surface** après ruissellement et lessivage de sols contaminés. Le cycle naturel de l'eau facilitera le transport des NP mais aussi des polluants éventuellement adsorbés à leur surface.

Il est important de noter que la structure physique des NP peut être modifiée par le contact avec l'eau.

Le fullerène (C₆₀), par exemple, réagit avec l'eau pour former des agrégats colloïdaux modifiant radicalement l'hydrosolubilité du fullerène (Fortner et coll., 2005).

Les agrégats sont stables durant 15 semaines dans les milieux aqueux avec une force ionique comparable à celle des eaux douces. Par contre, dans les eaux salées, ces mêmes agrégats sont instables et ne restent pas en solution.

Nous n'avons pas trouvé d'information sur le ou les processus de *dégradation* des NP dans l'environnement.

³⁰ HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

³¹ Réalisations conjointes de Bottero (CEREGE, Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence) et Wiesner (CEVE, Université Rice de Houston, Texas).

6.2.2 Ecotoxicité des NP

En matière d'*écotoxicité*, les NP manufacturées auront deux types d'impacts sur les organismes vivants, l'un lié à une toxicité intrinsèque, l'autre lié aux polluants adsorbés à la surface des particules.

A ce jour, il n'existe pas de données concernant la toxicité des NP pour **la flore**. On suppose que les plantes pourraient absorber les NP par les voies d'absorption habituelles du monde végétal, à savoir, le système racinaire et les stomates.

La toxicité des NP pour **la faune** est peu documentée actuellement, et les données disponibles sont souvent contradictoires ou sujettes à controverse.

Une équipe scientifique a beaucoup travaillé sur le sujet, celle d'Oberdörster Günter et de sa fille Eva. Leurs études portent sur les expositions de poissons et microcrustacés au fullerène (C₆₀) et aux NTC.

Parmi ces études, relevons celle où des poissons *Pimiphales promelas* sont exposés à des doses de 1 mg/l de C₆₀ solubilisé dans le tétrahydrofurane (THF), entraînant 100% de mortalité après 18 heures (Oberdörster et coll. 2006)

Une autre équipe (Zhu et coll.) a réalisé la même étude avec un fullerène solubilisé par simple agitation, sans toxicité pour les poissons.

Même si aucune information sur la toxicité propre du solvant n'est fournie, on peut penser que l'utilisation du solvant n'est pas neutre quant à la toxicité du fullerène pour les poissons.

Oberdörster et coll. ont également réalisé des études de toxicité aigue sur trois invertébrés marins et deux poissons avec du fullerène colloïdal à des concentrations variables, sans recours à l'ajout de solvants.

Les résultats pour les différents organismes ne permettent pas de tirer de conclusions générales quant à la toxicité du fullerène.

Les recherches de Stoimenov et coll. (2002) ont montré que des NP d'oxydes métalliques ont un pouvoir bactéricide sur certaines souches bactériennes comme *Escherichia coli* ou *Bacillus megaterium*.

Devant le peu de données disponibles, pour seulement quelques types de NP et quelques organismes vivants, certains pays ont initié des programmes de recherches afin d'identifier l'impact environnemental des nanotechnologies.

L'Agence américaine pour la Protection de l'Environnement, par exemple, dirige des programmes concernant la toxicité des NP photocatalytiques sur le zooplancton, les algues et les bactéries ou la répercussion des NP à base de carbone sur les processus microbiens des écosystèmes. Les résultats, attendus pour juin 2007, n'ont pas encore été rendus publics, du moins à notre connaissance.

6.3 Détection des nanoparticules dans l'environnement

Pour caractériser l'effet des NP sur l'environnement, encore faut-il pouvoir les détecter et les quantifier dans les différents compartiments de cet environnement !

6.3.1 Détection des NP dans l'air

Pour rappel, le défi lié à la détection des NP est le même que le défi de détection des PUF c'est-à-dire distinguer dans l'aérosol ambiant, les NP manufacturées des PUF anthropiques et des NP d'origine naturelle.

Les catégories d'appareils existants ont été très sommairement décrites dans le chapitre 2.5 « Métrologie des PUF ».

Par contre, la description et l'évaluation critique des appareils et méthodes actuellement disponibles ont été réalisées de manière détaillée par O.Regniers dans son mémoire « Les particules diesel ultrafines : techniques de mesure à l'émission et à l'immission ».

Nous retiendrons que pour détecter les NP (et les PUF) dans l'air, il n'existe pas de technique polyvalente, ce qui oblige à une approche multi-instruments à définir différemment pour chaque question.

Le problème, propre aux mesures dans l'environnement, est du au fait que les instruments restent encore des instruments de laboratoire, à savoir coûteux, encombrants et difficiles à utiliser.

6.3.2 Détection des NP dans les eaux

Si, dans un laboratoire de synthèse ou dans une unité de production, la caractérisation des NP ne pose pas de problème, il en va tout autrement dans l'environnement naturel.

En effet, dans le premier cas, les NP sont disponibles en quantité suffisante, la concentration des dispersions aqueuses peut être ajustée en fonction des techniques analytiques et des paramètres nécessaires aux calculs analytiques sont connus à priori.

Aussi, l'équipement classique d'un laboratoire de synthèse permet de répondre aux demandes de métrologie du laboratoire ou de l'unité de production, même si les techniques sont coûteuses, fonctionnent uniquement en différé et nécessitent un niveau de compétence élevé de la part des utilisateurs.

Dans le milieu naturel, les choses se compliquent car il faut pouvoir distinguer les NP naturelles des NP manufacturées. De plus, il est souvent impossible de connaître a priori certaines constantes exigées par une technique. Les faibles niveaux de contamination du milieu aqueux peuvent exclure certaines méthodes et la question de la représentativité de l'échantillonnage et de la validation des méthodes reste entière.

6.3.3 Détection des NP dans les sols

La détection des NP dans les sols peut être ramenée à un problème de métrologie dans l'eau en utilisant une technique de dispersion aqueuse pour traiter l'échantillon de sol.

La difficulté ne réside donc pas tant dans la préparation de l'échantillon, mais bien plus dans la mesure des NP dans une matrice sol beaucoup plus hétérogène qu'une matrice air ou eau car le sol contient de grandes quantités d'éléments traces provenant de la détérioration du substrat géologique et de nombreux éléments minéraux d'origine anthropique.

Dans les conditions actuelles, il est donc extrêmement difficile de distinguer le contenu naturel des apports anthropiques et d'identifier l'apport des NP industrielles.

Conclusions en matière de détection

Aujourd'hui, les techniques de mesure des NP sont peu nombreuses et souvent non-spécifiques.

Il reste donc un travail important à fournir pour assurer à l'avenir une surveillance efficace en continu de l'environnement.

Pour ce faire, il faut développer de nouveaux appareils, utilisant les paramètres les plus pertinents, capables de fonctionner en continu, mobilisables sur le terrain, relativement simple à utiliser...et pas trop coûteux ! Dans le même temps, il faudra fournir des NP de références.

Par conséquent, il faudra plusieurs années avant de disposer d'outils de terrain polyvalents, capables d'assurer une surveillance en continu des compartiments de l'environnement et encore deux à trois années supplémentaires pour appréhender les « maladies de jeunesse » des appareils, étudier les

variations journalières et saisonnières et développer de l'expérience dans l'utilisation des méthodes et l'interprétation des résultats³².

Commentaires

Les NP manufacturées et les nanotechnologies représentent un potentiel de progrès extraordinaire dans de nombreux domaines industriels de même que dans les domaines de la santé et de l'environnement.

Cependant, ce potentiel de progrès suscite des inquiétudes concernant les propriétés mêmes que les chercheurs et les industriels s'efforcent d'exploiter, face à la diffusion des NP dans les différents compartiments de l'environnement.

A la demande du gouvernement britannique, le groupe de travail interdisciplinaire, désigné par les deux sociétés savantes *Royal Society & Royal Academy of Engineering* et chargé de faire le point sur les nanosciences et les nanotechnologies, remet un rapport³³ au cours de l'été 2004.

Ce groupe de travail conclut que la plupart des nanotechnologies ne posent pas de nouveaux risques.

De même, pour les NP enrobées dans une matrice, le risque est faible.

Par contre, le cas des NP et des nanotubes « libres » est plus inquiétant.

Mais *pour l'instant*, il existe relativement peu de NP produites à l'échelle industrielle et jusqu'à présent, l'exposition aux particules libres est limitée aux ambiances de travail et à un petit nombre d'applications cosmétiques.

Les experts du groupe de travail mettent en évidence le manque d'informations disponibles au sujet de la nocivité des objets nanométriques pour l'environnement, soit parce que peu d'études ont été réalisées, soit parce que les études réalisées par les industriels restent confidentielles.

Devant les incertitudes qui pèsent sur les dangers potentiels, les experts recommandent de développer des programmes de recherche interdisciplinaire sur la toxicité, la persistance et la bioaccumulation des NP et des nanotubes dans l'environnement.

Certains programmes traitants de ces sujets sont en cours en Europe et aux Etats-Unis, comme mentionné plus haut.

Dans le doute, le groupe de travail recommande de limiter autant que possible le rejet de NP d'origine artificielle dans l'environnement, et d'exiger des industriels d'évaluer le risque de dégagement de NP durant tout le cycle de vie du produit.

Les experts recommandent également de développer des méthodologies et des instruments adaptés pour déterminer et évaluer la présence des NP dans l'environnement, au sens large.

³² Compte-rendu des conversations avec le Prof. J. Kummer

³³ Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004.

7. Conclusions et perspectives

Les effets sur la santé publique des particules atmosphériques sont aujourd'hui bien connus, même si tous les mécanismes d'action exacts ne sont pas toujours élucidés.

Les études expérimentales réalisées en laboratoire montrent que les caractéristiques des différents types de particules, présentes dans l'atmosphère, déterminent leur localisation dans l'appareil respiratoire, leur toxicité et les mécanismes de défense spécifique qui vont être impliqués face à l'agression que représente la pénétration de ces particules dans l'organisme.

C'est pourquoi, on verra les particules grossières se déposer préférentiellement dans le larynx et le pharynx tandis que les particules fines et ultrafines migreront plus loin dans les bronchioles et les alvéoles pulmonaires.

Or, plus la taille des particules diminue, au moins les mécanismes de défense « classiques » comme les macrophages se révèlent efficaces, permettant aux PUF de pénétrer dans la circulation sanguine par translocation épithéliale et endothéliale. Ce phénomène explique que les effets délétères des PUF ne se limitent pas au système respiratoire

En effet, arrivées dans la circulation, les PUF peuvent activer les plaquettes sanguines et augmenter ainsi le risque de thrombose, comme décrit dans des études d'expérimentation animale (voir les travaux de Nemmar détaillés précédemment).

La voie systémique permet aussi aux PUF de se distribuer dans le cœur, le foie ou le cerveau.

Les nombreuses expériences in vivo, essentiellement réalisées sur des rongeurs de laboratoire, confirment les résultats déjà mis en évidence par les études épidémiologiques qui montrent non seulement des effets sur le **système respiratoire**, avec irritation des voies respiratoires et inflammation pulmonaire, mais aussi sur le **système cardio-vasculaire**, avec des consultations médicales et des hospitalisations pour troubles du rythme cardiaque, thromboses et infarctus du myocarde dans les cas les plus graves.

Ces études épidémiologiques ont été détaillées par G.Collado dans le chapitre 3.1.4 de son mémoire « Analyse de données européennes sur la matière particulaire ».

Les effets néfastes de la pollution atmosphérique sur la santé ne font plus de doute après la publication de deux études de cohortes américaines dans les années '90 (Dockery et coll., 1993 ; Pope et coll., 1995) suggérant que exposition aux particules fines dans l'air ambiant et diminution de la durée de vie étaient liés. D'autres études (exposition à court et à long terme) viendront confirmer ce lien (Pope, 2002 ; Brunekreef, 2005).

Les études de cohortes, pour évaluer l'exposition à **long terme** aux particules, nous viennent, pour la plupart, des Etats-Unis et établissent un lien entre la mortalité et l'exposition à la fraction fine des particules (PM_{2,5}), la mortalité étant due en grande partie à des défaillances cardio-vasculaires. Par contre, la fraction grossière des particules (PM_{2,5-10}) n'est pas associée de manière significative à la mortalité.

Les Etats-Unis ont également produit des études portant sur l'évaluation d'une exposition à **court terme**, études qui indiquent un lien entre exposition aux particules et effets aigus en termes de morbidité et de mortalité.

L'OMS a réalisé une méta-analyse sur base d'études à court terme concernant 33 villes européennes, cette fois (OMS, 2004). Les résultats de l'étude montrent que si la charge en PM₁₀ augmente, le risque de mortalité totale et le risque de mortalité pour causes respiratoires ou cardio-vasculaires augmentent aussi.

Les données européennes sur les effets des PM_{2,5} étant très peu nombreuses, celles-ci ont été obtenues à partir de rapports sur les « fumées noires », dans la mesure où les fumées noires peuvent être considérées comme un indicateur relativement valable, pour évaluer les particules fines issues de procédés de combustion.

Les résultats de ces données européennes, utilisés dans une méta-analyse, montrent une association entre l'augmentation de la charge en « fumées noires » et l'augmentation du risque de mortalité.

Sur base d'études non-européennes, l'OMS a réalisé une méta-analyse attestant que les PM_{2,5} exercent un effet nettement plus important sur la mortalité (mortalité totale et mortalité due aux maladies respiratoires et cardio-vasculaires) que les PM₁₀.

La réaction de l'Europe se fera par étapes successives, en fonction de l'évolution des connaissances scientifiques...et du poids de certains lobbies.

Une étape importante a lieu en 1980 avec la première directive sur la qualité de l'air (Dir.80/779/CE), directive concernant *les valeurs limites et les valeurs guides de qualité atmosphérique pour l'anhydride sulfureux et les particules en suspension*.

Notons que les mesures des particules se font à l'aide de la méthode des « fumées noires » qui noircit des filtres spécifiques car la normalisation des particules par taille spécifique n'apparaîtra que fin des années '90.

Face aux évidences scientifiques des effets de la pollution atmosphérique, un pas important est franchi par l'Europe en 1996 avec la directive-cadre sur la qualité de l'air (96/62/CE) qui établit les principes d'évaluation et de gestion de la qualité de l'air dans tous les Etats membres. Les valeurs limites des polluants atmosphériques sont fixées par les directives filles dont la première (1999/30/CE) concerne les particules dans l'air ambiant.

Si la directive distingue pour la première fois les PM_{2,5} des PM₁₀, les valeurs limites sont fixées uniquement pour les PM₁₀ avec une limite journalière de 50 µg/m³ qui suit les valeurs indicatives recommandées par l'OMS.

Les PM_{2,5} ne sont pas soumises à des valeurs limites mais les Etats membres sont tenus de les mesurer et de communiquer les données à la Commission.

En janvier 2005, le rapport concernant l'application de la directive 1999/30/CE et les preuves scientifiques apportées par le Groupe de Travail de la Commission, ont incité celle-ci à continuer les efforts pour améliorer la qualité de l'air et à prendre en compte les PM_{2,5}.

En septembre 2005, l'Union Européenne présente la *stratégie thématique sur la pollution atmosphérique* (STPA) après avoir consulté le Parlement européen, les industries concernées, les ONG et les représentants des citoyens.

Rappelons que la STPA est la première des sept stratégies thématiques prévue par le 6^e Programme d'Action communautaire pour l'Environnement (PAE) présenté, lui, en 2001.

Le programme *Clean Air For Europe* (CAFE) est venu soutenir la STPA pour développer des analyses techniques et des plans d'action.

La STPA, qui vise à simplifier la législation environnementale et à intégrer la qualité de l'air dans les autres politiques européennes, est accompagnée d'une proposition de directive prévoyant pour la première fois des normes pour les PM_{2,5}

Cette stratégie thématique en matière de pollution atmosphérique a l'ambition de réduire de 40% le nombre de décès prématurés provoqués par les maladies liées à la pollution atmosphérique pour passer de 370 000 décès en 2000 (dont 348 000 dus aux particules fines) à 230 000 en 2020.

Toutefois, des scientifiques spécialistes des effets des particules fines sur la santé s'inquiètent des insuffisances de la proposition de directive car, d'une part, il n'existe pas d'objectifs contraignants pour la réduction de 20% des concentrations ambiantes des particules fines dans les Etats membres, et d'autre part, la valeur plafond pour les PM_{2,5} est trop élevée.

En effet, le projet de directive propose une valeur de 25 µg/m³ pour les PM_{2,5} alors que le Groupe de travail, constitué d'experts travaillant pour la DG Environnement, avance une valeur de 12 à 20 µg/m³, considérant le plafond de 25 µg/m³ comme non protecteur.

En définitive, la valeur de 25 µg/m³ ne concernera que les régions les plus polluées, de sorte que, une partie seulement de la population européenne profiterait des progrès réalisés.

Que s'est-il passé depuis septembre 2005 ?

En septembre 2006, après une première lecture au Parlement européen, la directive est votée mais amendée, avec comme conséquence un affaiblissement de la législation concernant les PM₁₀.

Ensuite, en octobre 2006, les ministres de l'Environnement confirment les orientations prises en juin 2006, après discussions au Conseil, sans retenir les amendements du Parlement européen. Selon l'accord obtenu au Conseil, la directive ne sera pas affaiblie mais ne sera pas non plus améliorée pour répondre aux critiques des scientifiques, avec le risque de produire une directive qui ne permette pas de participer à la réalisation des objectifs de la STPA.

La prochaine étape prévue dans le parcours de la directive aura lieu en décembre 2007, lors de la deuxième lecture au Parlement européen.

Quelle que soit l'issue de la deuxième lecture, la directive concernera, comme auparavant, la fraction des PM₁₀ et pour la première fois, la fraction des PM_{2,5} mais en aucune manière, les PUF malgré les études toxicologiques attestant de leurs effets néfastes sur la santé.

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de mesures concernant la fraction ultrafine des particules atmosphériques dont l'absence d'études épidémiologiques et le manque de techniques de mesure des PUF utilisables en dehors des laboratoires.

Les connaissances en matière de toxicologie des PUF résultent de nombreuses études expérimentales *in vivo* chez l'animal et *in vitro*. Ces études permettent de mieux comprendre les effets de la fraction ultrafine des particules et leurs mécanismes, même si le sujet reste très complexe.

Par contre, il n'existe pas d'études épidémiologiques centrées uniquement sur les effets des PUF sur la santé des populations exposées, toutes les études épidémiologiques consacrées aux particules se rapportant à la pollution particulaire urbaine, qui présente un très large spectre granulométrique. Pour être complet, signalons l'existence de quelques études panel dans le cadre du programme européen ULTRA, qui évaluent les effets aigus sur la santé après une exposition à court terme aux particules fines et ultrafines. Cependant, le nombre d'études et le nombre de sujets dans ces études sont trop limités pour tirer définitivement des conclusions.

Il est vrai que l'intérêt pour les PUF est relativement récent.

De plus, les techniques de mesures capables de distinguer spécifiquement les PUF dans l'atmosphère et utilisables « sur le terrain » ne sont pas encore au point.

Des progrès dans le domaine de la métrologie des PUF sont donc indispensables, progrès qui bénéficieront aussi à une véritable détection des NP manufacturées en milieu environnemental et industriel et à une quantification de l'exposition des travailleurs, des consommateurs et de la population en général.

Les progrès à réaliser sont d'autant plus urgents que le domaine des NP est en plein essor avec des productions industrielles de plusieurs centaines ou plusieurs milliers de tonnes pour certaines NP alors que dans le même temps, les effets sur la santé et l'environnement ont été très peu établis.

Il est évident que les industriels avancent plus vite que les toxicologues !

Mais il est vrai que dans le monde hautement compétitif des nanotechnologies, les budgets R&D sont infiniment plus élevés que les budgets consacrés aux recherches toxicologiques pour comprendre et donc prévenir les risques.

La question posée par l'article de Service, en 2004, dans le magazine *Science* reste d'actualité : « L'évolution dans ce domaine est-elle si rapide que nous courrions le risque de répéter les erreurs qui ont accompagné les précédentes révolutions techniques ? »

Or, en exagérant à peine, on peut dire que tout reste à faire pour maîtriser les connaissances et donc les risques liés à la production et surtout à l'utilisation des NP : caractériser les particules, définir leur réactivité et leurs interactions avec les tissus humains, déterminer leur devenir et leur toxicité dans l'environnement, étudier les potentiels d'exposition, initier des études épidémiologiques, etc.

La communauté scientifique attend également avec impatience les résultats des travaux de normalisation à l'échelle européenne (CEN³⁴) et internationale (ISO³⁵) pour progresser dans les possibilités d'évaluation des NP existantes et à venir.

Les défis sont donc nombreux pour réussir le développement des nanotechnologies tout en maîtrisant les risques potentiels des 1300 nanoparticules déjà commercialisées par plus de 80 producteurs, dans des pays à législations très diverses.

En Europe, il n'existe pas de réglementation spécifique pour les NP et les nanomatériaux, qui restent soumis à la réglementation relative à leur nature chimique c'est-à-dire à la nouvelle directive REACH³⁶.

Ainsi, la nanostructure sera considérée comme un risque particulier associé à une substance chimique déjà enregistrée sur le marché européen.

Certains scientifiques contestent ce choix car si les NP constituent un nouvel état de la matière, avec de nouvelles propriétés physico-chimiques et une nouvelle toxicologie, la forme nanostructurée du composé « classique » devrait être considérée comme une substance distincte dans la réglementation REACH (Afsset, 2006) et connaître une véritable procédure d'enregistrement, qui présente l'avantage de regrouper toutes les informations détenues par les producteurs via l'Agence Internationale.

La distinction devrait aussi porter sur le tonnage de la substance, car à moins d'une tonne par an et par fabricant, la substance ne fera l'objet d'aucun enregistrement, sauf si elle présente des propriétés préoccupantes. Or, de nombreux nanomatériaux produits pour des applications spécifiques représentent un petit tonnage et nous savons que ce n'est pas tant la quantité qui crée le danger des NP mais la surface et le nombre de particules déjà très importants pour des masses relativement faibles.

Si les NP manufacturées, durant leur cycle de vie, se retrouvent dans l'atmosphère, elles devraient être soumises aux mêmes normes que les PUF de combustion, pour autant que ces normes existent et ce n'est pas encore le cas.

Il faudra de nombreuses années pour que ces normes apparaissent, après le développement d'appareils de mesures adaptés, de méthodes de références, d'études épidémiologiques (et donc d'expositions préalables !) et d'études expérimentales reproductibles, comme pour les particules fines.

En conclusion, dans le cadre de la pollution atmosphérique, l'être humain réagit à ce qu'il connaît et appréhende ainsi successivement les particules grossières puis les particules fines et enfin les PUF, dans un contexte inévitable d'évolution des connaissances et des critères, pour produire des normes qui, à peine appliquées sont dépassées !

Les NP qui apportent autant de promesses que d'inquiétudes, s'inscrivent également dans cette évolution cyclique des performances techniques, des capacités de mesure et de la nécessité de faire constamment évoluer les normes afin de protéger l'être humain et son environnement.

³⁴ CEN : Comité Européen de Normalisation

³⁵ ISO : International Organisation for Standardization

³⁶ REACH : Registration Evaluation Autorisation of CHemicals

Bibliographie

- Abu-Allaban M et al. (2002). Exhaust particle size distribution measurements at the Tuscarora mountain tunnel. *Aerosol Sci Technol* 36, 771-789.
- Afsset-Les nanomatériaux: effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement-Rapport juillet 2006.
- Atkinson RW et al. (1999). Short-term associations between emergency hospital admissions for respiratory and cardiovascular disease and outdoor air pollution in London. *Arch Env Health* 54, 398-411.
- Beckett W et al. (2005). Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults: a human inhalation study. *Am J Respir Crit Care Med* 171 (10): 1129-35.
- Borm PJA et al. (2006). The potential risks of nanomaterials: a review out for ECETOC. *Particle and Fiber Toxicol*, 3: 11.
- Brown JS et al. (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 1240-1247.
- Brown DM et al. (2004). Effects of PM₁₀ in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir Research*, 5: 29.
- Cappel MJ. et Kreuter J. Effect of nanoparticles on transdermal drug delivery. *J Microencapsul* 1991, 8: 369-374
- Centeno MA et al. (2002). *Applied Catalysis A : General*, 234, 65.
- Chang-Chuan C et al. (2004). Personal exposure to submicrometer particles and heart rate variability in human subjects. *Envir Health Perspect* 112, 10: 1063-1067.
- Communication de la Commission au Conseil, au Parlement européen et au Comité économique et social. (2005). Nanosciences et nanotechnologies : Un plan d'action pour l'Europe 2005-2009. COM (2005) 243 final, 07.6.2005.
- Corachan M et al. (1988). Poedooniosis in Aequatorial Guinea. Report of two cases from different geological environments. *Trop Geogr Med*, 40: 359-364.
- Cortalezzi MM et al. Ceramic membranes derived from ferroxane nanoparticles: a new route for the fabrication of iron oxide ultrafiltration membranes. *J. Memb. Sci.* 227: 207-217
- Dockery DW et al. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329 (24), 1753-9.
- Elias Z et al. (2000). Cytotoxic and transforming effects of silica particles with different properties in SHE cells. *Toxicol In Vitro*, 14 (5): 409-22.
- European Commission-SCENHIR. (2007). Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the Technical Guidance documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials-29 March 2007.
- Ferin J et al. (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6 (5): 535-42.
- Fortner J et al. (2005). C₆₀ in water: Nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol* 39, 4307-4316.
- Grisel RJH et al. (2000). *Journal of Catalysis*, 191, 430.
- Haruta M et al. (1993). *Journal of Catalysis*, 144, 175.
- Hayashi T et al. (1998). *J. Catal.* 178, 566.

- Herve-Bazin B (2004). De la nécessité de faire un point sur les dangers des particules ultra-fines. *INRS-Hygiène et sécurité du travail-Cahiers de notes documentaires-PR 15-197-04*, 53-60.
- Herve-Bazin B (2005). Valeurs limites « poussières totales et alvéolaires » : nécessité d'une ré-évaluation. *INRS-Hygiène et sécurité du travail-Cahiers de notes documentaires-PR 16-198-05*, 55-64.
- Kato T et al. (2003). Evidence that exogenous substances can be phagocytised by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries. *Cell Tissue Res* 311, 47-51.
- Kawasaki T et al. (1999). A new animal model of thrombophilia confirms that high plasma factor VIII levels are thrombogenic. *Thromb Haemost* 81, 306-311.
- Kim S et al. (2004). Near infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*.22 (1): 93-97.
- Kreyling W et al. (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A* 65 (20): 1513-30.
- Kreyling W et al. (2006). Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *J Aerosol Med* 19 (1): 74-83.
- Kundu SK et al (1995). Description of an in vitro platelet function analyser PFA-100. *Semin Thromb Hemos*, 21 (suppl 2): 106-112.
- Lecoanet H et al. (2004). Laboratory assessment of the mobility of nanomaterials in porous media. *Environ Sci Technol* 38, 5164-5169.
- Lecoanet H et Wiesner M. (2004). Velocity effects on fullerene and oxide nanoparticle deposition in porous media. *Environ Sci Technol* 38, 4377-4382.
- Li XY et al. (1997). In vivo and in vitro inflammatory effects of particulate air pollution. *Envir Health Perspect* 105 (suppl 5): 1279-1283.
- Li X et al (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* 11: 709-731.
- Liao D et al. (1999). Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Envir Health Perspect* 107, 521-525.
- London:the Royal Soc & The Royal Acad of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. 2004.
- Maynard D et al. (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature*, vol 444, 267-269.
- Nemmar A et al. (1999). Inflammatory effect of intratracheal instillation of ultrafine particles in the rabbit : role of C-fiber and mast cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 160, 250-261.
- Nemmar A et al. (2001). Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Crit Am J Respir Care Med* 164, 1665-1668.
- Nemmar A et al. (2002a). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105 (4): 411-414.
- Nemmar A et al. (2002b). Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med* , 166: 998-1004.
- Nemmar A et al. (2003). Pulmonary inflammation and thrombogenicity caused by diesel particles in hamsters : role of histamine. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1366-1372.
- Nemmar A et al (2003a). Size effect of intratracheally instilled ultrafine particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 186, 38-45.
- Nemmar A et al (2003b). Diesel exhaust particles in lung acutely enhance experimental peripheral thrombosis. *Circulation* 107, 1202-1208.

- Nemmar et al. (2004). Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicology Letters* 149, 243-253.
- Nemmar A et al. (2004). Pharmacological stabilization of mast cells abrogates late thrombotic events induced by diesel exhaust particles in hamsters. *Circulation* , 110: 1670-1677.
- Oberdörster G et al. (1988). Size dependent lymphatic short term clearance of amosite fibers in the lung. *Ann Occup Hyg* 32 (suppl. 4): 149-156.
- Oberdörster G et al (1990). Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies. *J Aerosol Sci* 21 (3) 384-387.
- Oberdörster G et al. (1995). Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles? *Inhal Toxicol* 7 (1): 111-124.
- Oberdörster G et al. (1996). Ultrafine particles as a potential environmental health hazard. Studies with model particles. *Chest* 109, 6869S.
- Oberdörster G et al. (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* (96): 5-74; disc 75-86.
- Oberdörster G (2000). Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. *Philos Trans R Soc Lond A*, 358: 2719-2740.
- Oberdörster G et al. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Envir Health* 65 A: 1531-1543.
- Oberdörster G et al. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16 (6-7): 437-45.
- Oberdörster G et al. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2: 8.
- Oberdörster G, Oberdörster E and Oberdörster J (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Envir Health Perspect*, 113 (7): 823-839.
- Oberdörster E et al. (2006). Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: effects of fullerene on aquatic organisms. *Carbon* 44, 1112-1120.
- Objectif Prévention (2007)-Prevent-Les particules fines au coeur de l'actualité. N 442, mai 2007.
- Osier M and Oberdörster G (1997). Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundamental and applied toxicology* vol 40, issue 2, 220-227.
- Ostiguy C et al. (2006). Rapport-Les effets à la santé reliés aux nanoparticules-IRSST, mars 2006.
- Pekkanen J et al. (2002). Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease. *Circulation*, 106: 933-938.
- Pflucker F. et al. The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol* 2001, 14 (1), 92-97
- Pope CA et al. (1995). Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ Health Perspect* 103 (5): 472-480
- Pope III, CA et al (1999). Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J* 138, 890-899.
- Pope CA et al. (2002). Lung cancer, cardio-pulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J Am Med Assoc* 287 (9): 1132-1141.
- Preining O (1998). The physical nature of very, very small particles and its impacts on their behaviour. *Journal of Aerosol Science*, 29, 5/6, 481-495.

- Rehn B; et al. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol Appl Phamacol* 2003, 189: 84-95
- Sakurai H et Haruta M (1996). *Catalysis Today*, 29, 361.
- Salvi S et al (1999). Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 702-709.
- Samet JM et al (2000). Fine particulate air pollution and mortality in 20 US cities, 1987-1994. *New Engl J Med* 343, 1742-1749.
- Schaefer H. et Lademann J. The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol* 2001, 14 (1), 23-27
- Seaton A et al. (1995). Particulate air pollution and acute health effects. *The Lancet*, vol 345, Issue 8943, 176-178.
- Shi JP et al. (2000). Characterization of particles from a current technology heavy-duty diesel engine. *Environ Sci Technol* 34, 748-755.
- Shvedova AA et al. (2003). Exposure to carbone nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A* 66 (20): 1909-26.
- Stoimenov P et al. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* 18, 6679-6686.
- Tinkle S et al. (2003). Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* 111 (9): 1202-8.
- Ueda M Haruta (1999). *Gold Bulletin*, 32, 1.
- Warheit DB et al. (2005). Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci*, 88 (2): 514-24.
- Witschger O et Fabriès JF (2005).Particules ultra-fines et santé au travail: caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *INRS-Hygiène et sécurité du travail-ND 2227-199-05*, 21-35.
- Witschger O et Fabriès JF (2005).Particules ultra-fines et santé au travail: sources et caractérisation de l'exposition. *INRS-Hygiène et sécurité du travail-ND 2228-199-05*, 37-54.
- Xiong C and Friedlander SK (2001). Morphological properties of atmospheric aerosol aggregates. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11851-11856.
- Zhu Y et al. (2002). Concentration and size distribution of ultrafine particles near a major highway. *Air & Waste Manage Assoc* 52, 1032-1042.

www.wwf.be

www.greenpeace.org

www.chemsec.org

www.prc.cnrs-gif.fr

<http://europa.eu.int/scadplus>

<http://europa.eu/cgi-bin/etal.pl>